Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for sports- og familiedyrmedisin
Seksjon for smådyrsykdommer

Fordypningsoppgave 2024
Veterinærhøgskolen

En Litteraturstudie: Effekten av kreftvaksiner som et ledd i den multimodale behandlingen av melanom og lymfom hos hund – nåtidens status og fremtidige utsikter

A Review: The Efficacy of Cancer Vaccines as a Part of a Multimodality Treatment for Lymphoma and Melanoma in Dogs - Current Status and Future Prospects

Mina Bjone
Elin Maria Langeland

Veileder: Hanne L. Moberg

Innhold

Sammendrag 4

Definisjoner og forkortelser 5

3 Innledning 7

3.1 Kreft 7

3.1.1 Melanom 8

3.1.2 Lymfom 10

3.2 Immunsystemet 12

3.2.1 Kreftimmunologi 14

3.2.2 Immunterapi 16

3.3 Kreftvaksiner 17

3.3.1 Oncept 19

3.3.2 Anti-CSPG4 elektrovaksine 20

3.3.3 ApaVac 22

3.3.4 Tel-eVax 24

4 Formål 26

5 Materiale og metoder 27

5.1 Informasjonskilder 27

5.2 Søkestrategi 27

5.3 Seleksjonsprosess 29

5.3.1 Inklusjons- og eksklusjonskriterier 30

6 Resultater 32

6.1 Søkeresultater 32

6.2 Beskrivelse av relevante studier 33

6.2.1 Studier om terapeutiske kreftvaksiner mot OMM 33

6.2.2 Studier om terapeutiske kreftvaksiner mot DLBCL 35
6.2.3 Generelle studier om terapeutiske kreftvaksiner 36
7 Diskusjon 36
7.1 Har vaksinene effekt? 36
7.1.1 Oncept: 36
7.1.2 Anti-CSPG4 38
7.1.3 ApaVac: 40
7.1.4 Tel-eVax: 41
7.2 Utfordringer knyttet til forskning rundt kreftvaksiner 42
7.3 Fremtidige utsikter 44
7.4 Begrensninger knyttet til dette litteraturstudiet 47
Konklusjon 48
Takk til bidragsytere 48
Summary 49
Referanser 51

Sammendrag

Tittel: En litteraturstudie: Effekten av kreftvaksiner som et ledd i den multimodale behandlingen av melanom og lymfom hos hund – nåtidens status og fremtidens utsikter.

Forfatter: Mina Bjone, Elin Maria Langeland

Veileder: Hanne L. Moberg

Oralt malignt melanom (OMM) og diffust stort B-celle lymfom (DLBCL) på hund er to maligne kreftformer med dårlig prognose. Det er vist at immunforsvaret har mye å si for kreftutvikling, derfor kan immunterapi, slik som kreftvaksiner, ha stort potensiale i behandlingen av kreft.

Denne oppgaven er en litteraturstudie som har gjennomgått publikasjoner fra de siste 10 årene. Det er lagt fokus på terapeutiske kreftvaksiner som en del av et multimodalt behandlingsregime for nevnte krefttyper. Forfatterne har vurdert effekten av Oncept, Anti-CSPG4, ApaVac og Tel-eVax, og videre vurdert sikkerhet rundt bruk, utfordringer knyttet til kliniske forsøk og fremtidige muligheter.

Per i dag er det ikke mulig å konkludere sikkert om noen av de undersøkte vaksinene har effekt. For å muliggjøre dette er det et behov for mer omfattende forskning, men det er mange utfordringer knyttet til slike høykvalitative studier. Det er kostbart og tidkrevende å danne store nok og standardiserte studieutvalg. Samtidig reiser bruken av privateide hunder en rekke etiske problemstillinger.

Utover kreftvaksinenes spennende fremtidsutsikter innen veterinærmedisin, har det og potensiale til å gi resultater som har overførbarhetsverdi for mennesker med kreft.

Definisjoner og forkortelser

Forkortelse:	**Betydning:**
OMM	Oralt malignt melanom
DLBCL	Diffust stort B-celle lymfom/ Engelsk: Diffuse large B-cell lymphoma
WHO	Verdens helseorganisasjon/ Engelsk: World Health Organization
NK-celle	Naturlig drepecelle/ Engelsk: Natural Killer cell
CHOP	Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisone
MHC	Vevsforlikelighetsantigenkomplekser / Engelsk: Major histocompatibility complex
APC	Antigenpresenterende celle
TAA	Tumorassosierte antigener
DNA	Deoksyribonukleinsyre/ Engelsk: Diokxyribnucleotide acid/
DC	Dendrittcelle
HuTyDNA	Humant tyrosin kinase DNA
CSPG4	Chondroitin sulfat proteoglycan-4
HuCSPG4	Humant CSPG4
HuDoCSPG4	Human-hund-CSPG4 / Engelsk: Human-Dog-CSPG4
DoCSPG4	Hund-CSPG4 / Engelsk: Dog-CSPG4
ECM	Ekstracellulær matriks
HSP	Varmesjokkproteiner/ Engelsk: Heat-shock proteins
HSPPC	HSP-proteinkomplekser/ Engelsk: Heat-shock protein-protein complex

RNA	Ribonukleinsyre/ Engelsk: Ribonucleic acid
TERT	Telomerase revers transkriptase
USDA	United States Department of Agriculture
MST	Median overlevelse / Engelsk: Median survival time
PFI	Progresjonsfri overlevelse / Engelsk: Progression free interval
DFI	Sykdomsfritt intervall/ Engelsk: Disease free interval
TTP	Tid til progresjon
LSS	Lymfomspesifikk overlevelse / Engelsk: Lymphoma specific survival

3 Innledning

Lymfom og melanom er to alvorlige kreftformer som oppstår spontant hos hunder (Vail et al., 2020b; Vail et al., 2020c). For de aggressive tilfellene er det begrenset med behandlingsmuligheter, og fleste hunder dør eller avlives som følge av sykdommen (Pazzi et al., 2022; Vail et al., 2020b; Vail et al., 2020c). Det er et behov for utvikling av nye behandlingsmuligheter, og de siste ti-årene har immunterapi blitt forsket mye på (Abbas et al., 2016c). Terapeutiske kreftvaksiner er et felt innen immunterapi som har til hensikt å stimulere det adaptive immunforsvaret mot kreften (Marconato et al., 2019).

Oppgaven vil hovedsakelig diskutere behandlingsalternativer for OMM og DLBCL, med fokus på Oncept og Anti-CSPG4 mot OMM, og ApaVac og Tel-eVax mot DLBCL. Bakgrunnen for dette er hvor langt man har kommet i utviklingen av de ulike kreftvaksinene, og hvor hovedvekten av litteraturen ligger. Det publiseres stadig ny forskning på feltet, og det er flere vaksiner under utvikling enn det som nevnes i denne oppgaven.

3.1 Kreft

Onkologi, læren om kreft, er et aktuelt og viktig fagområde innen veterinærmedisin. Medisinen er i kontinuerlig utvikling, og vi har flere behandlingsalternativer enn før, noe som bidrar til at kjæledyrene våre lever lenger. En stadig eldre hundepopulasjon gjør at kreft oftere blir en problemstilling som veterinærer må ta stilling til. Hundene lever tett opp mot mennesker, og eksponeres for mange av de samme miljøtoksinene og stressorene som kan bidra til kreftutvikling. “Neoplasi” betyr nydannelse, og sikter til irreversible genetiske endringer i normale celler. Slike endringer gjør at de unngår intracellulære og omkringliggende kontrollmekanismer. De vil fortsette å vokse frem til de beveger seg utenfor

sine anatomiske grenser, hvor nydannelsen kan bli synlig makroskopisk. Nydannelser deles inn i benigne og maligne, som er en viktig differensiering for videre valg av behandling og prognose. Benigne neoplasier er godartede, og vil ikke metastasere. Maligne neoplasier har denne evnen, som innebærer invasjon og spredning til nærliggende vev eller andre organsystemer. Begrepet "kreft" brukes ofte synonymt med neoplasi, men sikter alltid til maligne prosesser. Maligne neoplasier vil ubehandlet som oftest føre til organsvikt og død for pasienten, mens benigne neoplasier ofte har avventende til god prognose (Zachary, 2017b).

3.1.1 Melanom

Melanom defineres som en epitelialtumor med utgangspunkt i melanocytter (Zachary, 2017b). Melanocytter produserer pigmentet melanin, og forekommer vanligvis i pigmenterte organ som behåret hud, klorand eller gingiva. Krefttypen forekommer hyppigere på hunder med mørkere hud- og hårlag, og utseende kan variere mellom små, runde til store, avflatede masser. Hunder over 11 år av blant annet rasene miniatyr puddel, Gordon setter og Chow Chow er overrepresentert (Vail et al., 2020c). Innen veterinærmedisinen kan en omtale melanomer som både benigne og maligne (Zachary, 2017b).

Gingiva og leppe er predileksjonssteder for melanomer (Vail et al., 2020c), og 90% av melanomer i munnhulen er maligne (Zachary, 2017b). I denne oppgaven legges det vekt på OMM.

De mest aggressive formene for OMM, vil ubehandlet, ha en overlevelsestid på 65 dager fra diagnosetidspunktet (Pazzi et al., 2022). De fleste melanomer inneholder rikelig med intracellulært synlig pigment, og er makroskopisk svarte. Likevel kan opptil 38% av melanomer karakteriseres som pigmentløse, også betegnet som amelanotiske, en tilstand

relatert til lav grad av celledifferensiering (Vail et al., 2020c). Den morfologiske diagnosen settes vanligvis på bakgrunn av cytologi og histologi, som vurderes etter en rekke kriterier for malignitet og karakteristikk for kreftcellenes opphav. Det er beskrevet en rekke immunhistokjemiske markører for OMM som viser høy sensitivitet og spesifisitet. Markørene kan brukes til å diagnostisere udifferensierte melanomer, der tradisjonell diagnostikk kan være utfordrende. Essensielle markører er Melan-A, PNL-2, TRP-1 og TRP-2 som er melanocytt-spesifikke antigener. En kombinasjon av disse fire markørene har en spesifisitet på 100% og sensitivitet på 93,9%, og regnes som diagnostisk gullstandard (Smedley et al., 2022). I tillegg vil proteinet Ki67 være et nyttig hjelpemiddel, da det er et protein som har økt uttrykk i celler i deling (Vail et al., 2020c). Aggressive tumorer har ofte høy Ki67-indeks og denne markøren kan gi viktig prognostisk informasjon om svulsten (Davey et al., 2021).

Stadiumsbestemmelse av orale melanomer er laget av Verdens helseorganisasjon (WHO). Dette gjøres på bakgrunn av størrelsen på tumoren (T) (T1:<2cm, T2: 2-4cm eller T3: >4 cm), omfanget av infiltrasjon i regionale lymfeknuter (N) (N0: ingen synlig infiltrasjon, N1: synlig infiltrasjon histologisk eller cytologisk, N2: fikserte lymfeknuter) og tilstedeværelse av fjernmetastaser (M) (M0: ingen tegn på metastase, M1: tegn på metastase). Det er fire stadier, og definisjonen av disse beskrives i tabell 3.1 (Owen, 1980; Vail et al., 2020c).

Tabell 3.1 Tabellen viser WHO sin inndeling av stadier for orale melanomer (Owen, 1980). T: Størrelse på tumoren. N: Infiltrasjon av regionale lymfeknuter. M: Tilstedeværelse av fjernmetastaser.

Stadiumsbestemmelse:	**Sammensetning av T, N og M:**
Stadium I	T1, N0, M0
Stadium II	T2, N0 og M0
Stadium III	T2, N1 og M0 eller T3, N0 og M0
Stadium IV	M1 og alle variasjoner av T og N.

Prognose er sterkt relatert til lokalisasjon, størrelse og stadiumsbestemmelse for melanom (Vail et al., 2020c). I tillegg vil graden av lokal invasjon og evne til å metastasere, være med å avgjøre behandlingsalternativer og prognose. OMM har evnen til å både invadere vev lokalt, hvor kjevebein er mest utsatt, og metastasere til lymfeknuter og til lungene (Vail et al., 2020a).

Kirurgi og ulike kjemoterapiprotokoller brukes i behandling av OMM på hund, men viser varierende og begrenset respons. Lokalisasjonen av OMM kan gjøre kirurgisk fjerning utfordrende, og internasjonalt kombineres derfor kirurgi med strålebehandling (Pazzi et al., 2022). Ulike former for immunterapi er under klinisk utprøving, blant annet kreftvaksiner, som omtale videre i denne oppgaven.

3.1.2 Lymfom

Lymfom er en sekkebetegnelse for en rekke subtyper av maligne neoplasier med utgangspunkt i lymfocytter (Zachary, 2017a). Subtypene kan ha ulike grader av malignitet, fra svært aggressive til sakte progredierende nydannelser. Uten behandling, varierer overlevelsestiden fra uker til mange år (Marconato et al., 2015b). Kreftformen kan oppstå på

ethvert stadie i lymfocyttens utvikling, og inkluderer både B-, T- og naturlige drepeceller (NK-celle) (Zachary, 2017a).

Lymfom utvikles vanligvis i lymfoide organer, herunder beinmarg, tymus, lymfeknuter og milt. Lymfom kan likevel oppstå i de fleste andre organer, særlig lymfatisk aktive organsystem som hud eller gastrointestinalkanalen. Etiologien til lymfom er ikke fullstendig kartlagt, men ansees som multifaktoriell. Kreftformen forekommer hyppigst hos middelaldrende til eldre hunder, og raser som Irsk setter, Rottweiler og St.Bernards hund er overrepresentert (Vail et al., 2020b).

Klinisk presentasjon er ofte perifer, multisentrisk og ikke-smertefull lymfadenomegali, med eller uten systemisk påkjenning. Som nevnt kan lymfom affisere andre organer, og derfor kunne gi kliniske tegn knyttet til disse (Vail et al., 2020b).

Histopatologisk undersøkelse av affiserte lymfeknuter vil være et diagnostisk viktig hjelpemiddel utover hundens kliniske presentasjon. Ved biopsi av lymfeknuten vil man ved noen typer lymfom se tap av den kortikomedullære strukturen med drag av neoplastiske celler (Zachary, 2017a). Finnålsaspirat med cytologisk analyse av en lymfeknute regnes og som en enkel, sensitiv, spesifikk og mindre invasiv metode for diagnostikk. Avvik som kan gi mistanke om lymfom er størrelsen på lymfocyttene, tydelig kjerne, basofilt cytoplasma og homogenitet i cellebilde (Vail et al., 2020b).

Når subtypen av lymfom er bestemt, både phenotype og/eller histologisk variant, vil neste ledd i diagnostikken være stadiumsbestemmelse. Dette er med å avgjøre prognosen for hver enkelt pasient. Her brukes i hovedsak WHO sitt kliniske stadiumsbestemmelsessystem, som

strekker seg fra stadium I til V. Stadium I forklares som affeksjon av en enkelt lymfeknute eller et lymfoid organ, ekskludert beinmarg. Stadium II affiserer flere lymfeknuter, men på samme side av diafragma. Stadium III brukes ved generalisert lymfeadenomegali. Stadium IV regnes som stadium I-III, i tillegg til affeksjon av lever eller milt. Til slutt, regnes stadium V som stadium I, II, III eller IV, samtidig som man ser affeksjon av blod, beinmarg eller andre ikke-lymfoide organer. Alle stadier klassifiseres i undergruppe a eller b, som forteller om det er systemisk påkjenning til stede (b) eller ikke (a) (MSD Manual, u.å.). De ulike stadiene av lymfom deles også grovt inn i lav-, mellom- eller høygradig lymfom (Vail et al., 2020b). Diffust stort B-celle lymfom (DLBCL) er den vanligst forekommende subtypen hos hund, og regnes alltid som høygradig (Vail et al., 2020b). Ingen andre subtyper vil bli diskutert videre i denne oppgaven.

Cytostatika er hyppigst bruk av de tradisjonelle behandlingsmetodene, men internasjonalt er også stråling tilgjengelig. Ved cytostatikabehandling benyttes en rekke ulike regimer, hvor kombinasjonsprotokoller som «CHOP-protokollen» er ansett som gullstandard. Det er også mulig å bruke enkelte cytostatika alene, kalt monoprotokoller. Median levetid for hund med DLCBL ved bruk av kombinasjonsprotokoller er 10-12 måneder (Vail et al., 2020b). Uten behandling er forventet levetid 4-6 uker fra diagnosetidspunktet (Vail et al., 2020b). Utover dette er immunterapi, blant annet kreftvaksiner, under utprøving.

3.2 Immunsystemet

Immunsystemet er kroppens eget forsvar mot alt «fremmed». Det kan for eksempel være infeksiøse agens, fremmedlegemer eller kreftceller. Det er et komplekst system bestående av en rekke organer, celler og molekyler som operer på ulike plan (Day & Schultz, 2014b).

Immunsystemet kan overordnet deles inn i to deler: det medfødte- og det ervervede immunforsvaret.

Kort beskrevet er det medfødte immunforsvaret førstelinjeforsvar, og består av kjemofysiske barrierer som hud og slimhinner, komplementsystemet, fagocyttiske celler og regulerende cytokiner (Abbas et al., 2016e; Bergman, 2023). Det medfødte immunforsvaret blir raskt aktivert ved behov, men er også mindre spesifikt enn det langsommere ervervede immunforsvaret (Bergman, 2023).

Det ervervede immunforsvaret deles igjen i to: humoral- og cellemediert immunitet. Humoral immunitet består av B-celler, som produserer antistoffer (Abbas et al., 2016e). Antistoffene kan aktivere komplementsystemet, fremme fagocytose av målceller, og indusere antistoff-avhengig cellulær cytotoksisitet. Cellemediert immunitet, også kalt cellulær cytotoksisitet, består av T-celler som kan differensieres til en rekke viktige immunceller, eksempelvis CD8+, CD4+, NK-celler og T-regs (Bergman, 2023).

Det ervervede immunsystemet er mer spesifikt ved at lymfocyttene kan kjenne igjen spesifikke antigener, og danne immunresponser på bakgrunn av disse (Norsk Helseinformatikk, 2023). Et antigen er ofte en molekylær struktur fra for eksempel en bakterie. B-cellene kjenner igjen en stor del makromolekyler, og noen små kjemikalier. Disse antigene kan være uttrykt på mikrobers overflate eller være i løselig form. T-cellene kjenner igjen fragmenter fra proteinantigener, og kun når de er presentert på vevsforlikelighetsantigenkomplekser (MHC) på antigen presenterende celler (APCer). APCer er spesialiserte immunceller, som ved fagocytose kan ta opp mikrober og løse antigener. De prosesserer antigenet intracellulært, for videre å presentere det for T-lymfocyttene via MHC-

molekyler på celleoverflaten. Dendrittiske celler regnes som den viktigste APCen (Abbas et al., 2016a). Den ervervede immuniteten, har i motsetning til den medfødte immuniteten, en evne til å «huske» og danne hukommelsesceller. En gjentatt eksponering for et antigen vil derfor kunne skape en større og mer effektiv respons (Abbas et al., 2016e).

Immunforsvaret har som beskrevet en unik evne til å beskytte kroppen mot "fremmede" antigener, samtidig som det ikke skal reagere mot eget vev. Hva immunsystemet regner som «eget» blir bestemt tidlig i utviklingen av immuncellene, gjennom en prosess kalt immunologisk toleranse(Abbas et al., 2016d). I tillegg opprettholder immunforsvaret en kontinuerlig balanse mellom aktivering og inhibering. Immunresponsen skal oppnå tilstrekkelig effektivitet for bekjempelse av patogener, samtidig som den reguleres nøye for å unngå for stor skade på eget vev, kalt hypersensitivitet. Her spiller en rekke viktige immunceller, reseptorer og cytokiner en rolle (Abbas et al., 2016b).

Medfødt og ervervet immunitet er ikke gjensidig utelukkende, og forekommer ofte samtidig. Det medfødte immunsystemet er med på å stimulere og påvirke det ervervede immunsystemet, i tillegg til at de deler flere av de samme aktiveringsmekanismene (Bergman, 2023).

3.2.1 Kreftimmunologi

I mange tiår har det vært kjent at immunsystemet spiller en rolle i forsvaret mot kreft. Et godt eksempel på dette er at immunsvekkede individer har en økt sjanse for å utvikle kreft. Det er også beskrevet at hvis man genmodifiserer mus til å mangle store deler av det ervervede immunforsvaret, resulterer det i en høy rate av spontane neoplasier (Bergman, 2023). Videre har man sett tumorremisjon ved å øke immunaktiviteten i en tumor (Abbas et al., 2016c).

Kontroll og eliminasjon av maligne kreftceller kalles kreftimmunovervåkning (Bergman, 2023)**.** Siden kreftceller stammer fra eget vev, har immunsystemet i utgangspunktet toleranse mot disse cellene. Modifiseringen som skjer med kreftcellene, gjør at de allikevel uttrykker en rekke molekyler som gjenkjennes som "fremmede" antigener. Dette kan være antigener som oppstår fra muterte gener i tumoren, produkter fra kreftfremkallende gener (onkogener) eller tumor supressor gener, samt selvproteiner som har økt ekspresjon i tumorcellen, noe som gjør dem immunogene (Abbas et al., 2016c). Dette kalles tumorassosierte antigener (TAA) (Bergman, 2023).

Kroppen er kontinuerlig i en balanse mellom immunforsvaret og utviklingen av neoplasier. Denne balansen beskrives i en hypotese kalt immunredigering-hypotesen som består av 3 faser. Den første fasen kalles *eliminiering,* hvor immunogene tumorceller blir gjenkjent og fjernet av immunsystemet. Dette er en kontinuerlig prosess. Det går over i andre fase når noen mindre immunogene tumorceller overlever, og det utvikles etter hvert en likevekt mellom tumorvekst og destruksjon ved hjelp av immunsystemet. Denne fasen kan hos noen individer vare i flere år, og kalles *likevektsfasen.* Siste fase kalles *unnvikelsesfasen,* og da overgår tumorveksten immunsystemets evne til bekjempelse. Det skjer gjennom immunsuppresjon, redusert immunogenitet på tumorcellene og rask tumorcellevekst(Day & Schultz, 2014a; Vail et al., 2020c) . Denne fasen forklarer hvordan fullt immunkompetente individer også kan utvikle mange ulike kreftformer (Abbas et al., 2016c).

Kreftcellene kan ha flere mekanismer for å danne et immunsuppresivt miljø. Noen kreftceller slutter å uttrykke TAAer, slik at immuncellene ikke kjenner de igjen. Andre kreftceller kan uttrykke ligander, cellulære bindingsseter, som hemmer T-celle aktivering, for eksempel PD-

L1. Noen tumorceller kan utnytte balansen mellom aktivering og hemming av T-celler, ved å ikke uttrykke kostimulerende reseptorer. Dette vil gi en overvekt av hemming, fremfor aktivering, av immunforsvaret. Tumorceller og andre immunceller i tumorvevet (slik som makrofager og beinmargsderiverte supressorceller) kan også direkte skille ut immunsuppressive cytokiner, som TGF-beta eller IL-10, eller de kan aktivere regulatoriske T-celler som nedregulerer immunresponsen (Abbas et al., 2016c). Andre cytokiner kan hemme APC-funksjonen gjennom inaktivering og/eller nedsatt modning av disse cellene (Bergman, 2023). Gjennom immunterapi er målet å snu disse prosessene, og rette kroppens immunforsvar tilbake mot kreftcellene (Abbas et al., 2016c).

3.2.2 Immunterapi

Immunterapi er et stort fagfelt, og kun en liten del skal omtales i denne oppgaven. Strategiene bak immunterapi er å stimulere pasientens egne antitumorrespons.

Ideen om å snu eget immunforsvar mot kreftceller ble allerede utforsket sent på 1800-tallet. Det startet med William B. Colley, som ved å injisere bakterieprodukter i en tumor, fikk den til å minske. I dag har vi mer kunnskap rundt immunologi, og vet at det trolig var aktiveringen av immunforsvaret som var bakgrunnen for tumorremisjonen (McCarthy, 2006). De siste 30-40 årene har forskningen gjort store fremskritt innenfor feltet (Abbas et al., 2016c). Håpet er blant annet at effektiv immunterapi vil kunne redusere eller eliminere bruken av cytotoksisk kjemoterapi, som angriper både normale og neoplastiske celler (Zachary, 2017b).

Immunterapi kan deles inn i uspesifikk og spesifikk immunterapi (Bergman, 2023).

Uspesifikk immunterapi stimulerer immunsystemet på en generell måte. Dette gjøres for eksempel ved øke T-celle aktivitet, ved å administrere rekombinante cytokiner som IL-2 (Day & Schultz, 2014a). Det kan også blokkere sjekkpunktproteiner, som er proteiner tumorene kan uttrykke for å hemme T-celleaktivitet. Ved å hemme disse, kan vi fjerne immunforsvarets "bremseklosser" (Kreftforeningen, 2023).

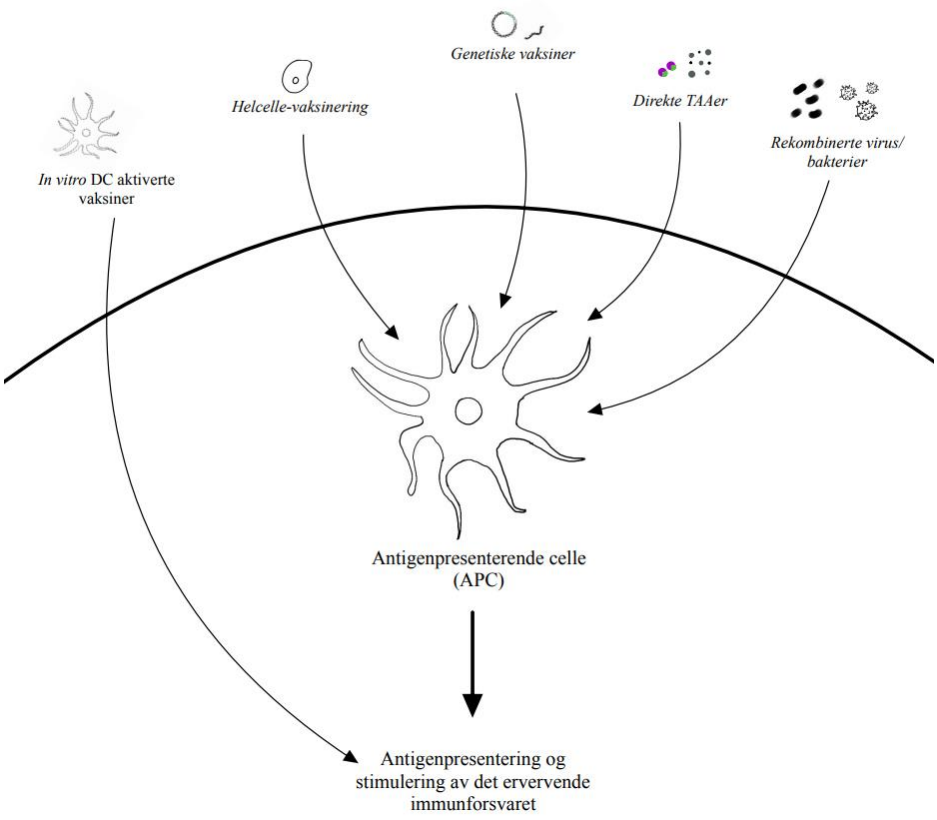
Spesifikk immunterapi går ut på rette immunforsvaret spesifikt mot kreften. Med spesifikk menes det at terapien klarer å differensiere mellom friske celler og tumorceller (Bergman, 2023). Terapeutiske kreftvaksiner bygger på dette, og retter immunforsvaret mot TAAer. Noen kreftvaksiner er autologe og er utvinnet fra den individuelle pasienten (Marconato et al., 2019). Andre kan være mer generelle mot TAAer som uttrykkes hos flere pasienter (Pellin, 2022), eller av flere typer kreftceller (Tarone et al., 2019). Som beskrevet har kreftceller en unik evne til å unngå immunforsvaret, så en kreftvaksine må kunne danne en sterk nok immunrespons mot spesifikke antigener, og kunne overgå det immunsuppressive miljøet som ofte finner sted i kreften (Bergman, 2023)

3.3 Kreftvaksiner

Terapeutiske kreftvaksiner er, som nevnt, en type immunterapi som skal stimulere immunsystemet til å kjenne igjen og angripe kreftceller. Målet med å bruke kreftvaksiner er at det skal være lett å administrere, det skal kunne angripe flere faser av kreftutviklingen, og kunne bekjempe kreften uavhengig av lokalisasjon og spredning (Impellizeri et al., 2014). Det er en rekke vaksinetilnærminger som er blitt utprøvd for å skape en anti-tumor immunrespons, illustrert i figur 3.3. Eksempelvis: vaksiner med hele kreftceller, vaksiner med dendrittceller som er lastet med TAAer (Atherton et al., 2016; Regan et al., 2016), genetiske og ikke-genetiske vaksiner (Impellizeri et al., 2018; Marconato et al., 2014). Genetiske vaksiner

baseres på viralt eller bakterielt genom, for eksempel plasmid dioksyribonukleotidsyre (DNA). Genomet lastes med gener som koder for TAAer det ønskes en immunrespons mot (Impellizeri et al., 2014). Ikke-genetiske vaksiner baseres på direkte injeksjon av TAAer i kombinasjon med immunstimulerende midler (Aurisicchio & Ciliberto, 2011). Vaksinene kan administreres på forskjellige måter, eksempelvis intradermalt eller intramuskulært. Ved bruk av DNA-vaksiner, må APCer først produsere antigenene fra DNAet, før de kan krysspresenteres på overflaten. For ikke-genetiske vaksiner, tas antigenene opp av APCer og krysspresenteres direkte uten egenproduksjon (Impellizeri et al., 2014).

Oncept, Anti-CSPG4 og Tel-eVax er alle DNA-vaksiner, mens ApaVac baserer seg på direkte injeksjon av protein sammen med adjuvans for å stimulere immunsystemet.



Figur 3.3 Figuren viser eksempler på ulike vaksinetilnærminger, som skal stimulere antigenpresentering og aktivere det ervervede. Figuren er laget av forfatterne. TAA: Tumorassosiert antigen, DC: Dendrittcelle, APC: Antigenpresenterende celle.

3.3.1 Oncept

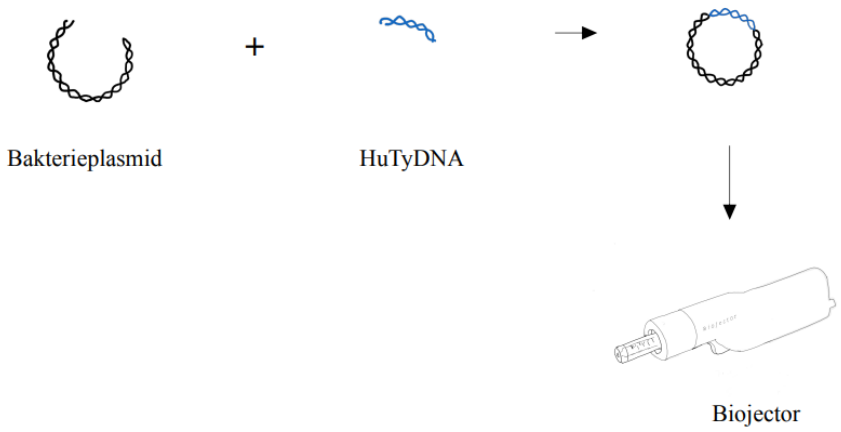
Oncept er en xenogen DNA-vaksine, utviklet som et ledd i behandlingen av malignt melanom hos hund. En xenogen DNA-vaksine betyr at det er brukt genom fra en annen art enn den arten vaksinen skal brukes på. Vaksinen er utviklet ved en metode, adaptert fra humanmedisinen, hvor man kloner DNA i et bakterieplasmid, og injiserer det i pasienten (Pellin, 2022; Wen & MacKenzie, 2013), vist i figur 3.3.1. Ønsket effekt er å få en systemisk immunrespons mot de proteinene uttrykt fra DNAet man injiserer, som i dette tilfellet er humant tyrosin kinase DNA (HuTyDNA). Tyrosin kinase er et melanosomalt glykoprotein som katalyserer dihydroxyfenylalanin, et viktig enzym i melaninproduksjonen (Bergman et al., 2006). Det er vist minst 85% likhet mellom menneskets og hundens tyrosin kinaser. Det innebærer nok likheter til at immunresponsen vil angripe neoplastiske melanocytter hos hunden, men ulike nok til at det dannes en immunrespons (Pellin, 2022).

Plasmid med huTyDNA injiseres i hud eller muskel, og vil bli tatt opp av APCer, i hovedsak dendrittiske celler. APCene utfører transkripsjon og translasjon av huTyDNA, og presenterer antigenet ved hjelp av MHC-molekyler. Det vil så stimulere en ervervet immunrespons, som angriper kreften der hundens tyrosin kinase uttrykkes.

DNAet er relativt enkelt og rimelig å produsere i store kvanta. I tillegg er bruken av bakterieplasmid immunstimulerende i seg selv, men det er likevel sett et behov for å øke immunreaksjonen ytterligere ved hjelp av spesifikke administrasjonsmåter (Bergman et al., 2006). Vaksinen pakkes og leveres i Biojector 2000® eller Vet Jet®, som er utstyr spesifikt laget for transdermal og intramuskulær injeksjon av kreftvaksiner (Pellin, 2022; Wen & MacKenzie, 2013). Administrasjonsmåten er nål-fri, og baserer seg på at vaksinen sprutes i en høytrykksstråle over huden, som traumatiserer området og aktiverer APCer (Impellizeri et al.,

2014). Vaksinen skal administreres i 0,4mL (Vet Jet®) doser 4 ganger med 2 ukers mellomrom. Produsenten anbefaler og en booster-dose etter 6 måneder. Injeksjonen skal skje intramuskulært og det anbefales å bruke mediale lårmuskulatur på bakbein, kaudalt for lårbeinet (*femur)* (Boehringer Ingelheim, u.å.).

I USA har Oncept siden 2010 vært godkjent som et biologisk produkt og behandling mot stadium I og II OMM, og selges kommersielt av Boerhinger Ingelheim (Atherton et al., 2016; Boehringer Ingelheim, u.å.). Vaksinen har ikke markedsføringstillatelse i EU eller Norge (Direktoratet for medisinske produkter, u.å. ; European Medicines Agency, u.å.).



Figur 3.3.1 Figuren illustrerer hvordan et bakterieplasmid klones med DNA som koder for humant tyrosin kinase. Vaksinen pakkes så i en Biojector 2000®, eller en Vet Jet® (Boehringer Ingelheim, u.å.). Figuren er laget av forfatterne. HuTyDNA: Humant tyrosin kinase DNA.

3.3.2 Anti-CSPG4 elektrovaksine

Anti-CSPG4 elektrovaksine er en xenogen vaksine mot malignt melanom hos hund, der man bruker en hybrid av menneskets og hundens Chondroitin sulfat proteoglycan-4 (CSPG4). I innledende forsøk ble det kun brukt humant CSPG4 (HuCSPG4), men det ble i senere forsøk

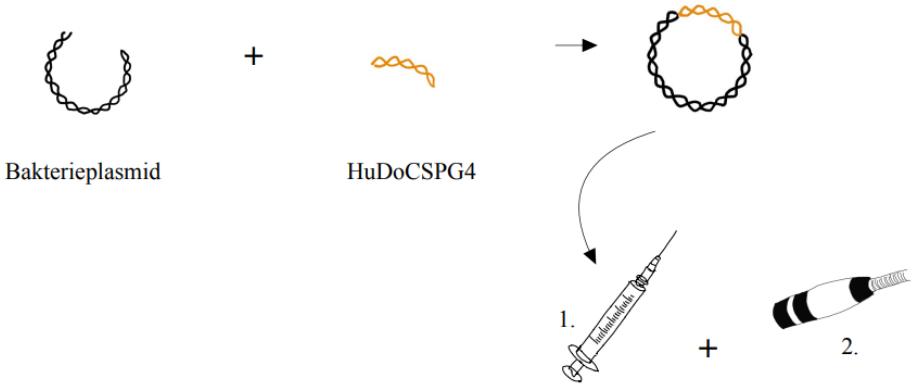
endret til en hybrid mellom menneskets og hundens CSPG4-genom (HuDoCSPG4) (Riccardo et al., 2014; Riccardo et al., 2022). Det er 82% likhet i aminosyresammensetningen mellom hundens CSPG4 (DoCSPG4) og HuCSPG4 (Riccardo et al., 2014). CSPG4 er et overflateprotein, som spiller en viktig rolle i de neoplastiske melanocyttenes proliferasjon, migrasjon og invasjon. Det er vist at HuCSPG4 bevares godt i forhold til både oppbygging og funksjon, til tross for at kreftcellene muterer og utvikler seg hyppig. I tillegg er det sett at CSPG4 uttrykkes i liten grad i friskt vev, og i stor grad i neoplastiske vev. Disse egenskapene gjør proteinet godt egnet som TAA i immunterapi (Riccardo et al., 2022).

Hybriden, HuDoCSPG4, blir klonet inn i et bakterieplasmid som injiseres intramuskulært, vist i figur 3.3.2. Det fagocyteres og presenteres av APCer, som aktiverer en ervervet immunrespons.

Vaksinen brukes i kombinasjon med elektroporasjon (Riccardo et al., 2014). Det innebærer at etter injeksjon av DNA-vaksinen, tilføres elektrisk pulsering som destabiliserer cellemembranen og øker permeabiliteten. Det skjer på nano- til millisekunder, men i dette tidsrommet er molekyler i ekstracellulærmatriks (ECM) tilgjengelig for cytoplasma i cellen. Elektroporasjon øker effektiviteten av DNA translokasjon fra ECM til vertens APCer. I sekundene til minuttene etter at elektropulseringen har opphørt, vil cellemembranen sakte stabiliseres igjen. Det er vist at plasmidleveransen er 100-1000 ganger mer effektiv ved elektroporasjon enn ved vaksinasjon alene (Sardesai & Weiner, 2011).

I hvilken grad CSPG4 uttrykkes på de neoplastiske melanocyttene, er sett i sammenheng med generell overlevelse og prognose. En kraftig overekspresjon av CSPG4 er relatert til redusert overlevelse, og kan kobles til sykdomsprogresjon (Tarone et al., 2019). Det er utviklet et

scoringssystem for hvor mye CSPG4 som uttrykkes på kreftcellene, og hver pasient scores fra 0 til 8. En score på 8 poeng indikerer sterkt uttrykk av CSPG4 på celleoverflaten, og derav hvor høygradig tumoren er (Riccardo et al., 2022).



Figur 3.3.2 Figur som illustrerer hvordan et bakterieplasmid klones med DNA som koder for en hybrid av menneskets og hundens CSPG4, HuDoCSPG4. Plasmidet injiseres intramuskulært (1.), deretter utføres elektroporasjon (2.) for å øke effektiviteten av DNA translokasjonen. Figuren er laget av forfatterne. HuDoCSPG4: Human-Dog-CSPG4.

3.3.3 ApaVac

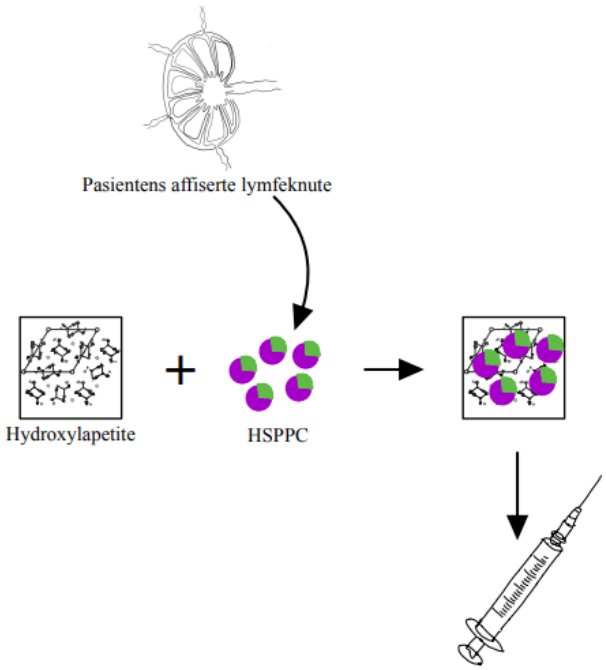
ApaVac er en autolog vaksine som i hovedsak består av to komponenter: hydroxylapatite og varmesjokkproteiner (HSP) spesifikke for pasientens egne kreftceller (Marconato et al., 2014). Autolog betyr at vaksinen inneholder komponenter fra pasienten selv (Børresen-Dale, 2022), og den produseres av et fransk firma kalt Hastim. På produsentens nettsider blir det beskrevet at ApaVac kan brukes mot en rekke krefttyper, og på ulike arter (hund, katt, hest). Hos hund er det B-celle lymfom det er gjort mest forskning på (Hastim, u.å.).

HSPer er en gruppe med proteiner som dannes i celler som utsettes for stress (Aarnes, 2019). De fungerer også som chaperoner, proteiner som hjelper andre proteiner og peptider å folde

seg riktig (Kristensen, 2019). Det dannes store mengder HSPer i kreftceller, og på grunn av chaperon-egenskapene vil de være bundet sammen med TAAer, kalt HSP-protein komplekser (HSPPC) (Marconato et al., 2014). Ved å bruke HSPPC i vaksinen vil immunforsvaret eksponeres for et stort repertoar av TAAer for immunisering (Dias et al., 2021). HSPPCer blir isolert fra pasientens affiserte lymfeknuter, og kobles sammen med hydroxylapetite (Marconato et al., 2015b) , dette er vist i figur 3.3.3.

Hydroxylapetite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) er et mineral brukt som et binde- og transportmiddel for HSPPC, og adjuvans til vaksinen. På injeksjonsstedet kjennes flere av nanopartiklene igjen som fremmed for kroppens immunforsvar, og er bakgrunnen for adjuvansegenskapene. Dette vil tiltrekke monocytter og makrofager, og dermed skape en sterkere immunrespons enn å bare injisere HSPPCer alene (Marconato et al., 2014).

Vaksinen injiseres intradermalt, og vaksineprotokollen består av åtte injeksjoner. Hver pasient vaksineres med sin spesifikke vaksine ukentlig i 4 uker, deretter hver fjerde uke i totalt 4 måneder. Vaksinasjonen skjer ofte i kombinasjon med kjemoterapi (Dias et al., 2021).



Figur 3.3.3 Figuren illustrerer hvordan HSPPCer blir isolert fra pasientens affiserte lymfeknuter, og kobles sammen med hydroxylapetite. Deretter injiseres vaksinen intradermalt. Figuren er laget av forfatterne. HSPPC: HSP-proteinkomplekser.

3.3.4 Tel-eVax

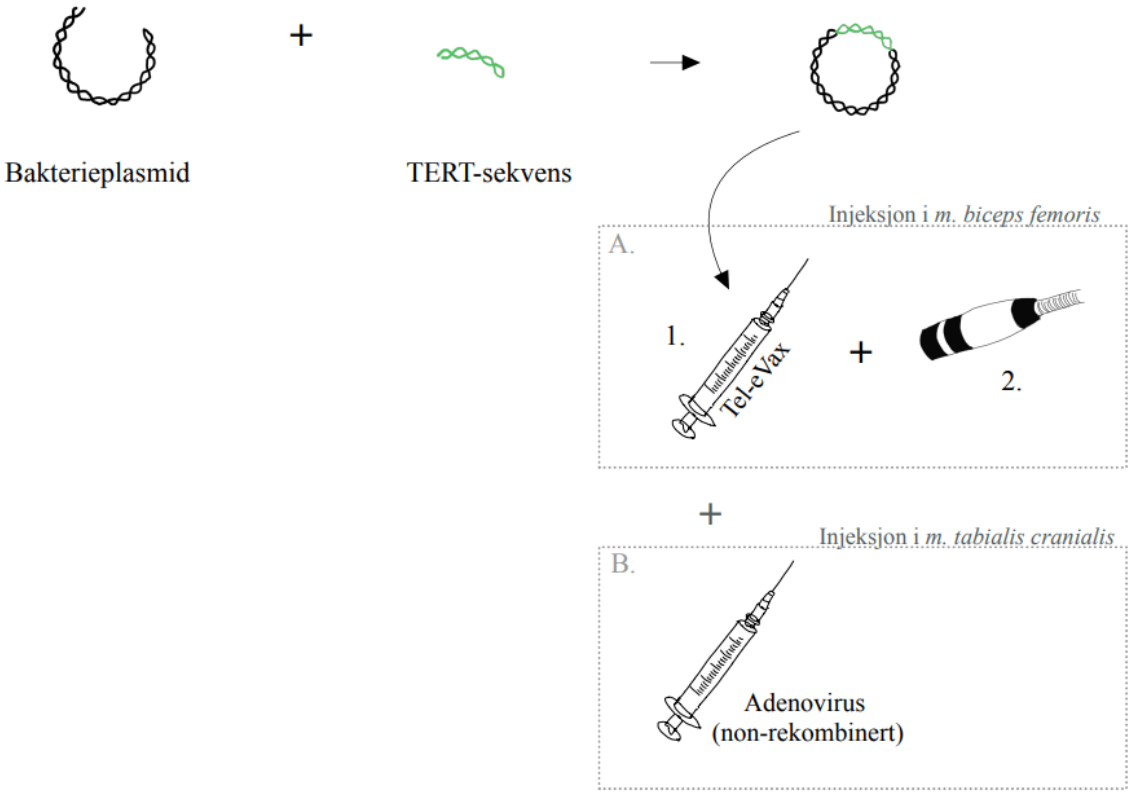
Tel-eVax er en vaksine utviklet mot DLBCL hos hund, og bygger på en to-stegs-injeksjonsprosess. Innledningsvis injiseres plasmid-DNA, etterfulgt av en booster-injeksjon med inaktivert, ikke-rekombinant adenovirus.

Telomerase er et protein som uttrykkes i over 90% av neoplastiske celler hos hund. Proteinets funksjon er essensiell for cellenes proliferasjon og levetid, da det regulerer lengden på DNA-molekylet. Det består av to komponenter: en ribonukleinsyre (RNA)-del og enzymkomponenten telomerase revers transkriptase (TERT). Man har sett at spesielt TERT uttrykkes i stor grad i neoplastiske celler, og i mindre grad i friske celler, som gjør det til et gunstig TAA (Impellizeri et al., 2018; Peruzzi et al., 2010). Plasmidet i vaksinen klones med

TERT-sekvensen, og viruskomponenten brukes for å skape en sterkere immunrespons, enn ved injeksjon av plasmidet alene (Impellizeri et al., 2014).

For å øke relokalisasjonen av plasmider og opptaket hos APCer, har forskningsgruppen som har utviklet Tel-eVax tatt i bruk elektroporasjon på lik linje med Anti-CSPG4 vaksinen. Elektroporasjon forklares nærmere i kap. 3.3.2.

Vaksineprotokollen brukes sammen med en standard kjemoterapiprotokoll over 27 uker (Impellizeri et al., 2018). Vaksinasjonen skjer under generell gassanestesi, og gis på to forskjellige anatomiske lokalisasjoner. Virusinjeksjonen injiseres i *musculus biceps femoris*, og består av 10^{11} virale partikler. DNA-komponenten blir injisert i *musculus tabialis cranialis*, fordelt på to 0,5ml doser injisert på forskjellige lokalisasjoner. I tillegg får hundene en eller flere sykluser av DNA-elektroporasjon, ved hjelp av Vet-ePorator (Impellizeri et al., 2018). Figur 3.3.4 illustrere denne prosessen.



Figur 3.3.4 Figuren illustrerer hvordan et varmelabilt *Eschericia coli* toksin-plasmid klones med en TERT-sekvens fra hundens DNA. A: Vaksinen injiseres i *musculus biceps femoris* (1.). Etterfulgt av vaksineinjeksjonen påføres proben (2.) som brukes til elektroporasjon. B: I tillegg injiseres hunden med non-rekombinert adenovirus i *musculus tibialis cranialis*, for å skape en kraftigere immunreaksjon. Figuren er laget av forfatterne. TERT: Telomerase revers transkriptase

4 Formål

Formålet med denne litteraturstudien var å skaffe til veie mer kunnskap om behandling med kreftvaksiner hos hund med melanom og lymfom. Det spesifikke målet med søket var å vurdere effekten av Oncept, Anti-CSPG4, ApaVac og Tel-eVax, samt ta stilling til utfordringer i forskningen og fremtidsmulighetene innenfor dette fagfeltet.

5 Materiale og metoder

I metodekapittelet beskrives planlegging og utførelse av litteraturstudiet. I tillegg blir seleksjonsprosessen for utvelgelse av publikasjoner presentert.

5.1 Informasjonskilder

Det ble brukt to databaser, PuBMed og Oria, til å utføre litteratursøket. PubMed er en database som samler biomedisinske artikler fra MEDLINE, vitenskapelige tidsskrifter og digitale bøker. Oria er Norges Miljø- og Biovitenskaplige Universitets biblioteksdatabase, der man kan gjøre søk i hele bibliotekets trykte og digitale samlinger.
Det endelige søket ble utført 22. januar 2024, og det er disse resultatene som blir presentert i oppgaven.

5.2 Søkestrategi

For at litteratursøket skulle kunne gjøres på en oversiktlig og presis måte, ble det brukt et PICO-skjema for å organisere søkeordene (Helsebiblioteket, 2021). Søket ble mer rettet mot veterinærmedisin ved legge til S (Species) som et element i skjemaet. (S)PICO er et akronym for engelske utrykk forklart ved:

S (species): Art

P (population/problem): Populasjon (f.eks. pasientgruppe)

I (intervention): Eksponering som populasjonen utsettes for.

C (comparison): Sammenlikning med en annen eksponering eller annet tiltak.

O (outcome): Utfall/endepunkt

(Helsebiblioteket, 2021)

Bakgrunnen for bruken av et (S)PICO-skjema var for å dele opp forskningsspørsmålet, slik at det ble søkbart i databasene. I dette litteratursøket ble det kun inkludert S, P, og I fra (S)PICO-skjemaet. C ble ikke inkludert, fordi problemstillingen ikke tok for seg noen sammenlikning. Forfatterne av denne oppgaven valgte også å ekskludere O-elementet, da innledende prøvesøk med dette elementet gav et veldig smalt resultat. Deretter ble det gjort en seleksjonsprosess som beskrevet i kap. 5.3.

Søket ble gjort på engelsk fordi en overvekt av forskning gjøres internasjonalt, og ved innledende prøvesøk ble det ikke funnet noen publikasjoner på norsk. En systematisk oppbygning av oppgavens søkeord er vist i tabell 5.2.

Tabell 5.2 (S)PICO –tabell for å strukturere oppgavens problemstilling til en søkealgoritme som kan brukes i ulike databaser.

	S	**P**	**I**	**C**	**O**
Problemstilling	Hund	Hund med melanom eller lymfom	Kreftvaksiner som en del av den multimodale kreftbehandlingen	-	-
Søkeord	Dog Canine	Lymphoma Melanoma	Vaccine Vaccination	-	-

I løpet av søket ble det gjort en kryssjekk for søkeord, for å forsikre om at de mest aktuelle publikasjonene ble inkludert i oppgavens resultater. Basert på de mest relevante studiene fra første prøvesøk, ble nøkkelord brukt som et hjelpemiddel for å finne mulige oversette søkeord. Dette resulterte i at ordet "vaccination" ble inkludert i (S)PICO- elementet "I".

I innledende prøvesøk ble også "immunotherapy" inkludert som et søkeord i (S)PICO-elementet "Intervention"(I). Dette resulterte i en stor mengde publikasjoner som ikke var aktuelle for satte problemstilling. Dermed ble det konkludert med av forfatterne å fjerne dette som et søkeord, og kun inkludere "vaccine" og "vaccination".

I begge databaser kan man gjøre avanserte søk, der man kombinerer søkeord for å spisse litteratursøket. "OR" inkluderer treff som omhandler det ene ordet, det andre ordet eller begge, og utvider på denne måten søket. "AND" begrenser søket ved å kun vise treff som omhandler begge søkeordene. Trunkeringstegnet(*) ble brukt for å få med ulike varianter og endelser på søkeordene. I PubMed ble det støtt på en utfordring med at "Dogs" ikke ble inkludert ved bruk av trunkeringstegnet. Det ble derfor besluttet å legge inn "Dogs" som et ytterligere søkeord under (S)PICO-elementet "Species"(S).

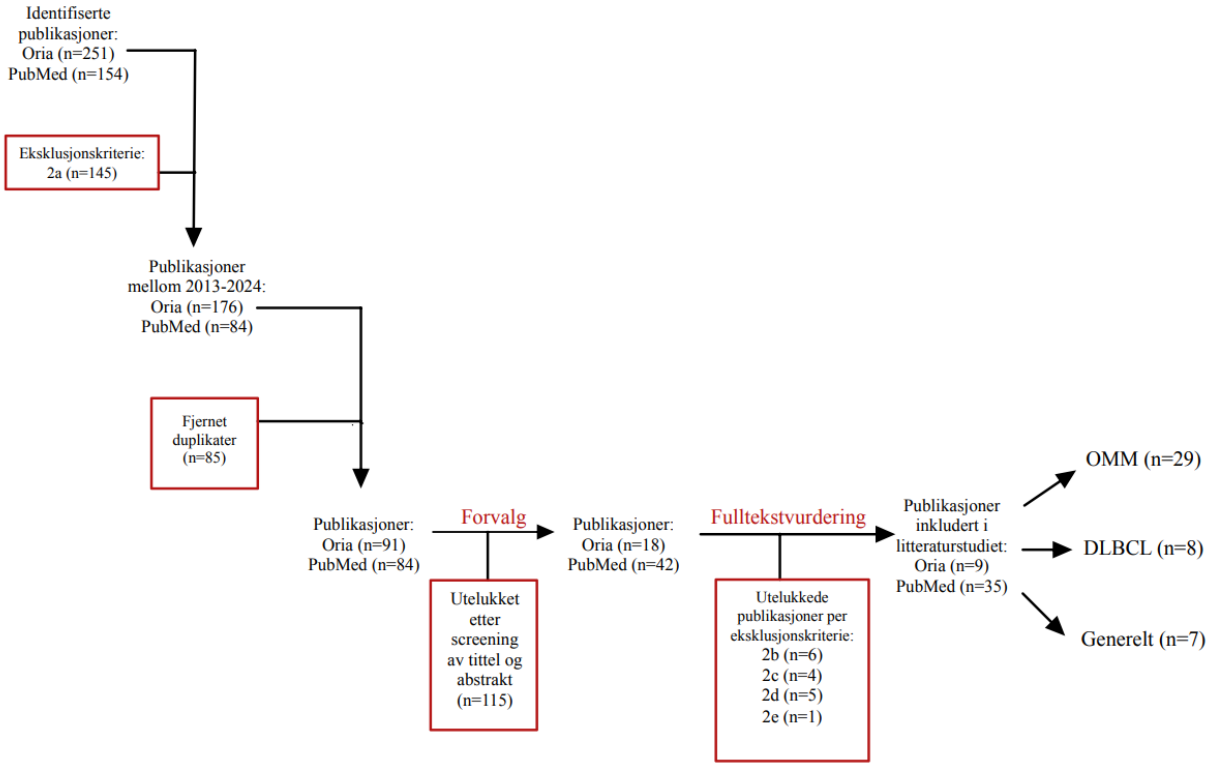
Søkealgoritmen ble da som følgende: (Dog* OR Canine* OR Dogs*) AND (Lymphoma* OR Melanoma*) AND (Vaccine* OR Vaccination*)

5.3 Seleksjonsprosess

Søkeprosessen ble etterfulgt av en seleksjonsprosess for å avgjøre hvilke publikasjoner som skulle inkluderes og ekskluderes.

For å få et oppdatert søk ble publikasjonsår satt til de siste 10 årene. Arbeidet med denne oppgaven ble startet i 2023, men det siste søket ble utført i starten av 2024. Dermed ble det besluttet å inkludere 2024, for å kunne få med de seneste publikasjonene (2013-2024). Tidsavgrensningen ble gjort tidlig i litteratursøket, da begge databaser har en funksjon for å begrense tidsrommet for utgitte publikasjoner. Det ble så sjekket for duplikater, og deretter

brukt en to-stegs seleksjonsprosess for å velge ut de publikasjonene som skulle inkluderes i oppgaven. I første steg ble publikasjoner inkludert på bakgrunn av tittel og sammendrag, og andre steg var en fulltekstvurdering for å avgjøre om publikasjonene kunne besvare oppgavens problemstilling. Seleksjonsprosessen er lagt frem i kronologisk rekkefølge i figur 5.3.



Figur 5.3 Figuren illustrerer, i kronologisk rekkefølge, et flytskjema med hvert trinn i seleksjonsprosessen. Figuren viser også hvilke kriterier publikasjonene ble inkludert eller ekskludert etter, forklart i kapittel 5.3.1. Til høyre vises søkeresultatene, og fordelingen av ulike publikasjoner er nærmere vist i tabell 6.1.a. OMM: Oralt malignt melanom. DLBCL: Diffust stort B-celle lymfom.

5.3.1 Inklusjons- og eksklusjonskriterier

For å forenkle seleksjonsprosessen ble det satt inklusjons- og eksklusjonskriterier. Publikasjonene måtte være på norsk eller engelsk, være fagfellevurdert, og tilgjengelig i

fulltekst. Publikasjonene skulle omhandle kreftformene lymfom eller melanom hos hund. De skulle omhandle kreftvaksiner, og ikke utelukkende andre kreftbehandlinger. Publikasjonene skulle med ulike tilnærminger omhandle Oncept, Anti-CSPG4, ApaVac eller Tel-eVax. En oversikt over alle inklusjons- og eksklusjonskriterier er beskrevet i tabell 5.3.1.

Tabell 5.3.1 Inklusjons- og eksklusjonskriterier som ble brukt for å forenkle seleksjonsprosessen av publikasjoner identifisert i litteratursøket. OMM: Oralt malignt melanom. DLBCL: Diffust stort B-celle lymfom.

Inklusjonskriterier	**Eksklusjonskriterier**
1a: Omhandler populasjonen hund	2a: Publikasjoner publisert før 2013
1b: Publikasjonen omhandler kreftformene OMM og DLBCL.	2b: Omhandler utelukkende en annen art enn hund
1c: Inneholder informasjon om bruk av kreftvaksinene Oncept, Anti-CSPG4, ApaVac, eller Tel-eVax	2c: Omhandler utelukkende andre kreftformer enn OMM og DLBCL.
1d: Publikasjonen er fagfellevurdert	2d: Omhandler utelukkende annen type kreftbehandling enn utvalgte kreftvaksiner: Oncept, Anti-CSPG4, ApaVac, Tel-eVax
1e: Tilgjengelig i fulltekst	2e: Fulltekst ikke tilgjengelig på engelsk eller norsk

6 Resultater

6.1 Søkeresultater

Etter endt litteratursøk ble det til sammen identifisert 154 publikasjoner fra PubMed og 251 publikasjoner fra Oria. Etter seleksjon for publikasjonsår og duplikater, ble 175 publikasjoner tatt med til et forvalg. 60 publikasjoner ble selektert ut til fulltekstvurdering. I figur 5.3 er det en oversikt over antall publikasjoner som ble ekskludert på bakgrunn av de ulike eksklusjonskriteriene, beskrevet i kap. 5.3.1. Etter endt seleksjonsprosess ble til sammen 44 publikasjoner vurdert til å kunne være med å besvare oppgavens problemstilling. Oversikt over antall artikler inkludert etter de ulike stegene i seleksjonsprosessen vises i tabell 6.1a.

Tabell 6.1a Oversikt over antall artikler identifisert i de to databasene, og antallet artikler inkludert etter de ulike stegene i seleksjonsprosessen.

	Identifiserte publikasjoner	**Publikasjoner publisert de mellom 01/01/2013 og 22/01/2024**	**Publikasjoner inkludert etter sjekk for duplikasjoner**	**Publikasjoner inkludert etter gjennomgang av tittel og sammendrag**	**Publikasjoner inkludert etter gjennomgang av fulltekst**
PubMed	154	84	84	42	35
Oria	251	176	91	18	9
Totalt	405	260	175	60	44

Da oppgaven omhandler to ulike kreftformer hos hund ble det besluttet å dele inkluderte publikasjoner i to hovedgrupper, «OMM» og «DLBCL». Dette for å kunne systematisk gjennomgå litteraturen publisert om hver kreftform. Publikasjoner som ikke utelukkende beskrev utvalgte kreftvaksiner på melanom eller lymfom ble satt i en tredje gruppe, kalt «Generelt». Studiene ble også gruppert etter type studiedesign, og fordelingen er vist i tabell 6.1b. Der det var behov ble flere primærkilder sporet tilbake fra oppgavens inkluderte publikasjoner. Disse primærkildene inngår ikke i resultatene som beskrives i tabellene 6.1a eller 6.1b.

Tabell 6.1b Oversikt over antall studier som er inkludert basert på hovedtema og studiedesign. OMM: Oralt malignt melanom. DLBCL: Diffust stort B-celle lymfom.

	Prospektiv studie	**Retrospektiv studie**	**Kasusrapport**	**Litteraturstudie**	**Andre publikasjoner**	**Sum**
OMM	5	7	2	13	2	**29**
DLBCL	5	1	-	2	-	**8**
Generelt	-	-	-	5	2	**7**
Sum	**10**	**8**	**2**	**20**	**4**	**44**

6.2 Beskrivelse av relevante studier

6.2.1 Studier om terapeutiske kreftvaksiner mot OMM

Det ble identifisert 29 publikasjoner som omhandlet bruk av Oncept og/eller Anti-CSPG4 som behandling mot OMM hos hund. Resultatene besto av kasus-kontroll studier, kasusserier, kasusrapporter, og systematiske litteraturstudier. Det er blitt lagt mest vekt på studiene som

har spesifikt undersøkt effekt og sikkerhet av vaksinene, og litteraturstudier som har oppsummert og vurdert tilgjengelig publikasjoner.

Oncept fikk midlertidig godkjennelse som behandling mot stadium II og III OMM av USDA (United States Department of Agriculture) i 2007. Denne godkjennelsen kom etter en søknad som baserte seg på forskningen utført av Bergman et al. i 2006. Forskningen tydet på humoralrespons av vaksinen og at den var trygg å bruke på hund (Bergman, 2023; Pellin, 2022). Godkjennelsen var et stort skritt for immunterapi til hund, og det er i ettertid blitt publisert en rekke forsøk som bruker Oncept i et multimodalt behandlingsregime (Berry et al., 2022; Boston et al., 2014; Finocchiaro et al., 2015; Grosenbaugh et al., 2011; Kim et al., 2023; McLean & Lobetti, 2015; Ottnod et al., 2013; Treggiari et al., 2016; Turek et al., 2020; Verganti et al., 2017; Zuleger et al., 2017). I tillegg til kliniske forsøk, er det også publisert flere systematiske litteraturstudier av publiserte kilder, blant annet M. A. Pellin i 2022 (Pellin, 2022) og Pazzi et al. i 2022 (Pazzi et al., 2022).

Innenfor rammene av oppgavens litteratursøk har det blitt publisert fire kliniske forsøk på utelukkende Anti-CSPG4, etterfulgt av elektroporasjon, som behandling mot OMM (Giacobino et al., 2021; Piras et al., 2017; Riccardo et al., 2014; Riccardo et al., 2022). De to tidligste publikasjonene (Piras et al., 2017; Riccardo et al., 2014), er kasus-kontroll studier som bruker Hu-CSPG4 som komponent i vaksinen, og noen av kasusene overlapper i disse to studiene. Publikasjonen av Riccardo et al. fra 2022 beskriver også en kasus-kontroll-studie, men bruker hybrid HuDo-CSPG4 som vaksinekomponent (Riccardo et al., 2022). Giacobino et al. har ikke spesifisert om de har brukt HuDo-CSPG4 eller Hu-CSPG4 (Giacobino et al., 2021).

6.2.2 Studier om terapeutiske kreftvaksiner mot DLBCL

Det ble etter endt søk inkludert 8 publikasjoner som omhandlet ApaVac og Tel-eVax. Disse ble sortert i gruppen "Lymfom", se tabell 6.1b.

I resultatene som omhandler ApaVac var det i hovedsak Marconato et al. som har utført kliniske forsøk. Denne forskningsgruppen er også de som står bak utviklingen av vaksinen. Laura Marconato har ledet kliniske forsøk med både aktive og historiske kasus-kontroll grupper (Marconato et al., 2014), og deretter oppsummerte sine funn i en litteraturstudie som strakk seg over 5 år (Marconato et al., 2015b; Marconato et al., 2019). Grunnet studiedesignet, er det hovedsakelig lagt vekt på publikasjonene fra 2014 (Marconato et al., 2014), en randomisert, blindet placebo-kontroll studie, og litteraturstudien fra 2019 (Marconato et al., 2019). Samme forskningsgruppe beskrev også effekt av vaksinen i 2015 (Marconato et al., 2015b), i tillegg til å se om forholdet mellom lymfocytter og monocytter, kan vurdere prognosen til vaksinerte pasienter (Marconato et al., 2015a). D. Thamm har vurdert forskningen til Marconato et al., men ikke utført egne kliniske forsøk for denne vaksinen (Thamm, 2019). Det er og inkludert en publikasjon som har omtalt ApaVac, sammen med andre kreftvaksiner (Dias et al., 2021).

I resultater som omhandlet Tel-eVax var det to publikasjoner som har utført kliniske forsøk i vårt begrensede tidsrom (Gavazza et al., 2013; Impellizeri et al., 2018). I tillegg er det inkludert en ekstern primærkilde av Peruzzi et al fra 2010, hvor blant annet A.Gavazza er medforfatter (Peruzzi et al., 2010). Publikasjonene utvalgt i denne oppgaven er basert på kasus-kontroll studier. Gavazza et al har et dobbelt-armet kasus-kontroll studie, og Impellizeri et al bruker historiske kontroller.

6.2.3 Generelle studier om terapeutiske kreftvaksiner

En rekke publikasjoner inneholdt ikke utelukkende informasjon om de enkelte vaksinene, men nevnte flere i sammenheng. De ble sortert ut i gruppen "Generelt", vist i tabell 6.1b. Det ble valgt å inkludere disse publikasjonene i litteraturstudiet, da de ga et større perspektiv som kunne være med å besvare oppgavens problemstilling. Disse publikasjonene besto eksempelvis av artikler fra tidsskrifter rundt temaet (Regan et al., 2016), utdrag fra bøker (Impellizeri et al., 2014), eller publikasjoner om generell immunterapi (Bergman, 2023) som hadde avsnitt knyttet opp mot en eller flere av de fire vaksinene.

Denne gruppen med publikasjoner ble vurdert til å kunne gi et verdifullt innblikk i bruken og mulighetene til kreftvaksiner, men er ikke lagt særlig vekt på i spørsmålet om effekt eller sikkerhet hos vaksinene.

7 Diskusjon

7.1 Har vaksinene effekt?

7.1.1 Oncept:

Litteraturen viser splittede resultater når det kommer til effekten av Oncept. Det er forskjeller i hva studiene har satt som mål på effekt. Majoriteten har sett på MST (Boston et al., 2014; Grosenbaugh et al., 2011; McLean & Lobetti, 2015; Ottnod et al., 2013; Treggiari et al., 2016; Turek et al., 2020; Verganti et al., 2017), og noen har i tillegg sett på progresjonsfri overlevelse (PFI) (Ottnod et al., 2013; Treggiari et al., 2016; Turek et al., 2020) eller sykdomsfritt intervall (DFI) (Ottnod et al., 2013). I alle forsøkene er Oncept brukt i tillegg til annen behandling, i hovedsak lokal kirurgi og/eller stråling. To studier har vist svært positiv effekt med bruken av Oncept (Grosenbaugh et al., 2011; McLean & Lobetti, 2015). MST for

vaksinerte hunder var betraktelig lenger i begge studier, sammenliknet med historiske kontrollgrupper. Grosenbaugh et al. sin studie har i ettertid blitt kritisert for at de i stor grad sensurerte den behandlede populasjon (Pellin, 2022). Kun 15 av de 53 vaksinerte hundene var grunnlag for de gode resultatene (Grosenbaugh et al., 2011; Pellin, 2022). Det var allikevel resultatene fra denne studien som i 2010 ga Oncept full godkjennelse som biologisk produkt i USA. For å få en slik godkjennelse kreves det at produktet trygt kan brukes, og at man trolig kan forvente effekt. Oncept har ikke fått godkjennelse som kreftbehandling, da dette vil kreve mer omfattende forskning, inkludert randomiserte, placebo-kontroll studier (Pellin, 2022).

En rekke studier har i ettertid vist at vaksinen ikke har like god effekt som først antatt (Boston et al., 2014; Ottnod et al., 2013; Treggiari et al., 2016; Turek et al., 2020; Verganti et al., 2017). Noen av studiene har egne kontrollgrupper (Boston et al., 2014; Ottnod et al., 2013), mens andre har sammenliknet seg med historiske kontroller eller kontrollgrupper fra andre studier (Treggiari et al., 2016; Turek et al., 2020; Verganti et al., 2017). De finner ingen signifikant forskjell i MST (Boston et al., 2014; Ottnod et al., 2013; Treggiari et al., 2016; Turek et al., 2020; Verganti et al., 2017) eller DFI (Ottnod et al., 2013) mellom de vaksinerte og ikke vaksinerte pasientene.

Uavhengig av om publikasjonene konkluderer i retning av at Oncept har effekt eller ikke, er det mangler i de fleste studiene. Eksempelvis er vaksinen testet på små populasjoner, de mangler komparative kontrollgrupper, eller standardiserte behandlingsprosedyrer.
I oppgavens resultater ble det inkludert flere kasusrapporter der Oncept er brukt sammen med andre behandlingsprotokoller enn kirurgi og/eller stråling. Eksempler er kjemoterapeutika (Kim et al., 2023), annen genterapi (Finocchiaro et al., 2015) eller tyrosin kinase inhibitorer (Berry et al., 2022). Alle disse publikasjonene er kasusrapporter om én hund, og

tilleggsprotokollene vil kunne påvirke resultatene. De illustrer hvordan Oncept forsøksvis kan brukes som en del av multimodale behandlingsstrategier, men det er vanskelig å trekke store slutninger til den generelle hundepopulasjonen, eller si noe konkret om effekten av Oncept.

Hovedvekten av litteraturen heller mot at Oncept ikke har forventet effekt, men det er svakheter i forskningen som gjør det vanskelig å konkludere sikkert. Uavhengig av effekt er det få bivirkninger, noe som er positivt for videre utprøving.

7.1.2 Anti-CSPG4

Vaksiner basert på CSPG4 som behandling mot OMM, er fortsatt tidlig i utviklingsfasen, men viser lovende resultater. Federica Riccardo er medforfatter i alle publikasjonene, og har spilt en sentral rolle i utviklingen av vaksinen.

Riccardo et al., i 2014 og 2022, samt Piraz et al. i 2017, har publisert studier om bruk av Anti-CSPG4 elektrovaksinasjon på hunder med OMM stadium II-III, etter lokal tumorkontroll (Piras et al., 2017; Riccardo et al., 2014; Riccardo et al., 2022). For at en pasient skulle bli en aktuell vaksinekandidat i disse studiene måtte tumoren uttrykke CSPG4 med en score på >3/8. Det ble testet for antistoffer mot CSPG4 hos de vaksinerte hundene, for å måle vaksineindusert immunrespons (Piras et al., 2017; Riccardo et al., 2014; Riccardo et al., 2022). I publikasjonene fra 2014 og 2017, ble det brukt HuCSPG4 som hovedkomponent i vaksinen. I begge disse forsøkene ble antistoffenes effekt målt ved å bruke HuCSPG4 cellelinjer *in vitro* (Piras et al., 2017; Riccardo et al., 2014). Resultatene indikerer at antistoffene hadde en direkte effekt på disse humane cellelinjene. Det ble derimot bare spekulert i om at de samme antistoffene har tilsvarende effekt mot DoCSPG4 *in vivo* (Piras et al., 2017). Dette var bakgrunnen for at det ble utviklet en vaksine som inneholder et

hybridplasmid som koder for HuDoCSPG4, og publikasjonen fra 2022 beskriver bruken av denne (Riccardo et al., 2022). Effekten av vaksinene i alle tre publikasjoner viste en signifikant lenger MST for de vaksinerte gruppene, uavhengig om det var med HuCSPG4 eller HuDoCSPG4.

I Piras et al. sin studie ble i tillegg diskutert om vaksinen øker mengden antistoffer i slimhinnen, og om dette kunne ha effekt på lokalt tilbakefall av OMM (Piras et al., 2017). Dette ble etterprøvd i 2022 av Riccardo et al., og det ble da brukt DFI som et mål på effekt. Resultatet viste en positiv trend mellom økte antistoffnivåer i slimhinnen og forlenget DFI (Riccardo et al., 2022).

Giacobino et al. publiserte en studie i 2021, men har ikke spesifisert om det ble brukt HuCSPG4 eller HuDoCSPG4. Studiepopulasjonen viser større variasjon sammenlignet med de tre andre studiene, grunnet inkludering av hunder med OMM stadium I til IV. Formålet med studien var å undersøke forskjeller i MST og DFI blant hunder som gjennomgikk kurativ kirurgi eller marginal kirurgi. Den inkluderte også en spesifikk subgruppe av vaksinerte hunder, der 82 av 155 kasuser fikk elektrovaksine mot CSPG4. Denne studien viste også en signifikant forskjell i MST og DFI hos vaksinerte hunder, i forhold til de uvaksinerte (Giacobino et al., 2021).

I de fire publikasjonene om Anti-CSPG4-vaksinering fremkommer det en svakhet ved at studiene involverer relativt små populasjoner, samt at de hverken er randomiserte eller blindet. Dette vil kunne føre til bias knyttet til tolkningen av resultatene. Giacobino et al. har også, som nevnt, en bred variasjon i stadium-bestemmelsene, noe de selv har påpekt kan påvirke resultatene (Giacobino et al., 2021). I 2022 publikasjonen beskriver Riccardo et al. at

noen av de vaksinerte pasientene hadde en negativ utvikling av sykdommen. De diskuterer at dette kan skyldes unnslippelse av CSPG4-negative kloner, grunnet det immunologiske trykket som oppstår ved vaksinering. De understreker derfor også viktigheten av å finne flere TAAer for en mer effektiv multimodal behandling av OMM (Riccardo et al., 2022).

Litteraturen i dag peker i retning av at Anti-CSPG4 baserte vaksiner kan fungere, men at vi ikke har nok studier for å konkludere sikkert. Før godkjennelse som behandling, kreves det flere uavhengige, randomiserte og blindede placebostudier. Det er allikevel en positiv trend i effekt, og vaksinen virker til å ha lite bivirkninger.

7.1.3 ApaVac:

Litteraturen indikerer at ApaVac-vaksinen kan ha en effekt når den brukes sammen med kjemoterapi. Effekten hos pasientene er sett ut ifra parameterne tid til progresjon (TTP), lymfom-spesifikk overlevelse (LSS) og antistoff-produksjon. I tillegg er det blitt vurdert sikkerhet rundt bruk av vaksinen, og forskerne har sett på ulike metoder som kan måle vaksineeffekt.

Publikasjonen av Marconato et al. i 2014 er en dobbelt-blindet, randomisert, placebo-kontroll studie. Den viste at det var en signifikant forskjell i TTP, og en tydelig immunreaksjon hos den vaksinerte gruppen (Marconato et al., 2014). I tillegg ble det utført en litteraturstudie i 2019 av Marconato et al., som samlet data fra 300 hunder, ved to onkologiske sentre, i løpet av en femårsperiode. Resultatene viste at TTP og LSS var signifikant bedre i den vaksinerte gruppen (Marconato et al., 2019). Marconato et al. sine publikasjoner fra 2015 viser også en signifikant effekt av vaksinen (Marconato et al., 2015a; Marconato et al., 2015b).

Til tross for gode resultater, er det ikke mulig å komme med en sikker konklusjon om at vaksinen har effekt. Dette er fordi publikasjonen med tyngst troverdighet, Marconato et al. 2014, er basert på et lite studieutvalg (n=19). I 2019 har D.Thamm kritisert studieutvalget til denne studien, og skjevheten i gruppeinndelingen (Thamm, 2019). Det samme kommenterte Marconto et al. i egen litteraturstudie fra 2019 (Marconato et al., 2019). D. Thamm mente at dette kunne ligge til grunn for de dårlige resultatene i kontrollgruppen.

For å kunne konkludere med at vaksinen har signifikant effekt, kreves det mer omfattende og standardirisert forskning. I tillegg er det ønskelig at andre forskningsgrupper kan etterprøve metoden, for å få et mer nyansert resultat.

7.1.4 Tel-eVax:

Resultatene fra publikasjonene antyder at Tel-eVax har en effekt og ingen åpenbare bivirkninger. Impellizeri et al. og Gavazza et al. konkluderte med at det ble dannet en immunrespons hos vaksinerte individer. Begge målte effekten ved å se på generell overlevelse (Impellizeri et al., 2018), og fikk en signifikant forskjell mellom vaksinerte og ikke-vaksinerte individer. Gavazza et al. så i tillegg på TTP, men fant her ingen signifikant forskjell (Gavazza et al., 2013). Både Gavazza et al. og Impellizeri et al. har brukt samme metode med elektrovaksinering og adenovirusinjeksjon, i kombinasjon med en standard kjemoterapiprotokoll. Kjemoterapien kan påvirke immunforsvaret, og trolig effekten av vaksinen (Peruzzi et al., 2010). Gavazza et al. har selv uttalt at vaksinen ikke har effekt alene, og begrunner dette med at immunresponsen bruker tid på å bli aktivert, og fungerer bedre hos individer med mindre grad av sykdom (Gavazza et al., 2013).

Litteraturen tyder på at Tel-eVax har effekt sammen med kjemoterapi, men det er mangler i publiserte studier. Lite standardisering iblant annet type kontrollgruppe, gjør sammenligning av resultater utfordrende. Impellizeri et al. har brukt historiske kontroller fra et geografisk begrenset område, mens Gavazza et al. har brukt en dobbelt-armet modell med en aktiv kontrollgruppe. Det er også behov for mer omfattende forskning, da begge kliniske forsøk er basert på relativt små studieutvalg, med 42 (Gavazza et al., 2013) og 45 (Impellizeri et al., 2018) hunder. Som nevnt, er det ikke sett effekt av vaksinen alene, men den kan allikevel bli viktig i et multimodalt behandlingsregime.

7.2 Utfordringer knyttet til forskning rundt kreftvaksiner

Studiene som er blitt gjennomgått i dette litteraturstudiet, bærer preg av at forskningen rundt kreftvaksiner enda er tidlig i utviklingsfasen.

For alle fire vaksiner er det et behov for større, randomiserte og blindede placebo-kontroll studier. Dette er viktig for å minimalisere bias og placeboeffekt, samt for å kunne generalisere resultatene. Uavhengig av hvor i utprøvingsfasen vaksinene står, er slike studier kompliserte å gjennomføre. I denne oppgavens resultater var det kun Marconato et al. i 2014 som hadde gjennomført en slik studie, men det var, som beskrevet, flere mangler knyttet til denne studien (Marconato et al., 2014; Thamm, 2019).

Gjennomgående i litteraturen var små og varierte studieutvalg, noe som påvirker hvilke konklusjoner som kan trekkes fra resultatene. Det er et behov for større og mer standardiserte studier, for å bedre kunne representere studiepopulasjonen. Individuelle forskjeller mellom hundene som utvikler kreft (rase, alder, stadiumsgrad, tumorlokalisasjon etc.), gjør standardiseringen av studiegrupper komplisert. Hvis vaksinene skal godkjennes som

behandling, bør utvalget av hunder representere den generelle hundepopulasjonen, og det er da gunstig med et utvalg fra et større geografisk område. For å sikre så like behandlingsløp som mulig vil dette kreve utarbeiding av standardiserte behandlingsprotokoller, og et tett samarbeid mellom behandlere.

Økonomi bidrar sannsynligvis til utfordringen med å få gjennomført slike storskalastudier. Innenfor smådyrmedisin er det lite offentlig- og kommersielle midler som utstedes, og behandlinger blir oftest finansiert av eiere. Blindede, placebo-kontroll studier er tidkrevende, kostbare og krever store ressurser. Forfattere av denne oppgaven ser derfor at manglende insentiver kan bli en viktig bidragende faktor til at slike studier ikke så lett lar seg gjennomføre.

I de kliniske forsøkene er det privateide hunder som brukes i utvalget. Da disse typene forsøk både er kostbare og tidkrevende, er man avhengig av eiernes samarbeidsvilje. Det krever at eierne oppdager sykdom tidlig, og har mulighet, samt motivasjon, til oppfølging. I tillegg er det de som til slutt bestemmer når livsavsluttende behandling settes inn. Eierkommunikasjon blir derfor avgjørende for å gjøre dette aspektet mindre variabelt i forsøkene.

Etisk er placebo-kontroll studier vanskelig å forsvare, fordi kontrollgruppen ikke mottar potensielt livsforlengende behandling. I tillegg er randomiserte og blindede studier utfordrende, fordi få eiere vil godta at deres hund havner i kontrollgruppen (Tarone et al., 2019). For Oncept er det allikevel blitt diskutert at denne typen studier både er etisk forsvarlig og berettiget, grunnet ingen forskjell i MST hos vaksinerte og uvaksinerte hunder (Boston et al., 2014).

En annen utfordring er hvordan effekten av vaksinene måles samtidig med bruken av andre behandlingsmetoder. Alle studiene har brukt vaksinene sammen med for eksempel kirurgi, kjemoterapi, eller annen immunterapi. Det kan diskuteres om behandling med vaksinene alene, uten innvirkning fra andre behandlingsformer, vil kunne gi et mer presist mål på effekt. Det finnes allerede godt etablerte behandlingsmetoder for både OMM og DLBCL (Pazzi et al., 2022; Thamm, 2019), og det vil derfor også reise seg et etisk spørsmål rundt å ikke bruke disse metodene. Det er vanskelig å forsvare behandling med en vaksine uten sikker effekt, mot en behandling der man har sikrere resultater. På den andre siden er det ikke nødvendigvis et håp om at kreftvaksiner skal bli en solitær behandlingsform, men en del av et multimodalt behandlingsregime. Dette er sett i forskningen med Tel-eVax, der vaksinen ikke har effekt uten kjemoterapi (Gavazza et al., 2013; Peruzzi et al., 2010). Bergman har uttalt at immunterapi, inkludert kreftvaksiner, trolig skal brukes side om side med tradisjonell kreftbehandling (Bergman, 2023). Det samme beskriver Regan et al. at mange, om ikke alle, immunterapier som utvikles, skal forsterke tradisjonell behandling (Regan et al., 2016). Derfor kan det diskuteres at studiene som måler effekt er mer aktuelle sammen med andre behandlingsformer, men det er da igjen viktig med standardiserte protokoller, slik at resultater kan sammenliknes.

7.3 Fremtidige utsikter

Som tidligere etablert, er det et godt stykke vei igjen før kreftvaksiner kan anses som en pålitelig og effektiv behandlingsmetode for OMM og DLBCL. Det er derfor viktig å se den fremtidige betydningen av forskningen, både fra et veterinærmedisinsk ståsted, men også knyttet til komparativ medisin.

OMM og DLBCL er krefttyper med malign karakter, og overlevelsestid fra diagnosetidspunktet er kort. Det er begrenset effekt av tradisjonelle behandlingsstrategier, og det er et stort behov for nye og mer effektive behandlingsmodaliteter (Pazzi et al., 2022; Pellin, 2022). Majoriteten av studiene motiveres av mulighetene for effektiv immunterapi, og en forhåpning om at det skal kunne bli en viktig brikke innen kreftbehandling (Dias et al., 2021). Den midlertidige godkjennelsen av Oncept i 2007, var et viktig startskudd for utviklingen av kreftvaksiner innen veterinærmedisin.

Uavhengig av effekt for de ulike vaksinene, er forskningen er et steg i riktig retning. Det er sett at flere typer immunterapi, inkludert kreftvaksiner, feiler grunnet tumorenes immunsuppressive miljø. Derfor er det aktuelt å kombinere kreftvaksiner med medisiner som kan inaktivere, eller redusere, tumorens evne til dette (Regan et al., 2016). Det er også sett at cytoreduksjon bedrer den totale responsen av behandlingen (Gavazza et al., 2013; Giacobino et al., 2021), og vil kunne bli en viktig nøkkel for videre utvikling av behandlingsregimene. Bergman beskriver at den optimale kreftvaksinen, utover den umiddelbare bekjempende effekten, har en langsiktig og preventiv virkning (Bergman, 2023). Det er med andre ord et ønske om å forlenge DFI, ved at sirkulerende immunoglobuliner skal forebygge metastaser (Dow, 2019).

Bergman har videre uttrykt at hans forskning også skal kunne bidra på humansiden (Bergman, 2023), og komparativ medisin går begge veier. Eksempelvis er CSPG4 sentral i forsøk på hund, men antigenet er også en velkjent TAA for humant malignt melanom. Det er et veldig attraktivt onkoantigen, som kan skape store muligheter for både veterinær- og humanmedisin Dette er knyttet til at CSPG4 uttrykkes av mange tumortyper, og høyere ekspresjon i

tumorcellene er sett i sammenheng med kortere MST, samt mer aggressive tumortyper (Tarone et al., 2019).

Det er et behov for å optimalisere den animalske modellen i legemiddelutviklingen (Dow, 2019). I dag brukes i hovedsak standardiserte forsøksdyr, men gnagere har ikke den samme heterogene kompleksiteten som oppstår mellom immunforsvaret og kreftcellene, som hos menneske (Bergman, 2023; Dias et al., 2021). I tillegg er det sjelden at spontane tumorer oppstår i disse sterile miljøene, og kreften må derfor ofte fremprovoseres. Hundens immunforsvar er mer kompetent, de lever lenge, utsettes for mange av de samme miljøfaktorene som mennesker, og det er en stor likhet i utviklingen av ulike kreftformer hos hund og menneske (Dias et al., 2021; Dow, 2019). Hunder blir på bakgrunn av dette sett på som gunstige modeller innen kreftformer som lymfom og melanom. Trolig vil ikke behandling kunne overføres direkte mellom hund og menneske, men de kan være viktige modeller for utvikling av konsepter, og for å se på effektivitet og sikkerhet av ulike behandlingsformer (Glikin & Finocchiaro, 2014).

Uavhengig av effekten til kreftvaksinene, tilsier resultatene fra studiene at alle vaksinene er sikre å bruke. Det er sett noen bivirkninger, som halthet, knyttet til elektroporasjon, men det var forbigående (Riccardo et al., 2022). I tillegg krever elektroporasjon anestesi, som medfører en viss risiko hver gang vaksinen skal administreres (Piras et al., 2017). Her tas det en vurdering av kost-nytte, da elektroporasjon øker plasmidopptaket betraktelig (Sardesai & Weiner, 2011). Fravær av alvorlige bivirkninger knyttet til bruk av vaksinene er positivt for videre studier, og åpner for større forsøk. Det er kun Oncept som er kommersielt tilgjengelig (Bergman, 2023), noe som skaper et større rom for utprøving av denne vaksinen sammenlignet med de andre.

7.4 Begrensninger knyttet til dette litteraturstudiet

Immunterapi, inkludert kreftvaksiner, er et bredt tema, og denne oppgaven har kun vurdert et begrenset utvalg av forskning på feltet. Det ble lagt vekt på de fire vaksinene med mest litterær tyngde, noe som gjorde at flere kliniske forsøk rundt andre metoder, TAAer eller vaksinekomponenter, ble ekskludert.

Innledningsvis ble det besluttet å ta i bruk to databaser, i en tidsperiode på 10 år, og at dette var tilstrekkelig for å besvare forskningsspørsmålet. Det vil allikevel være en begrensning som kan medføre at aktuell litteratur ikke ble inkludert. Eksempelvis måtte noen primærkilder inkluderes for å komplementere søket. Det kan diskuteres om det hadde vært positivt for denne litteraturstudien å utvide tidsperioden til 15-20 år, da deler av den innledende forskningen er gjort i denne perioden. Derimot var det nødvendig å begrense omfanget av oppgaven, og ønskelig med oppdatert litteratur, for å kunne ta stilling til nåtidens status.

Forfatterne av denne oppgaven hadde et ønske å formulere et eksklusjonskriterium om skjevhet/bias, spesielt med tanke på finansiert forskning som kan skape en interessekonflikt. Det ble allikevel besluttet å ikke ha med finansiering som et eksklusjonskriterium, da utviklingen av kreftvaksiner i dag har stor kommersiell interesse.

Oppgaven inkluderer kun fire vaksiner, på to krefttyper, innenfor et tema som strekker seg langt utenfor disse grensene. Det blir derfor ikke mulig å trekke konklusjoner rundt generell bruk av kreftvaksiner fra denne oppgaven. Det var en overvekt av resultatene knyttet opp mot Oncept-vaksinen, trolig grunnet dens godkjennelse som biologisk produkt. Dette skapte en skjevfordeling i informasjonsmengden, som kan ha bidratt til at det med større sikkerhet kan trekkes konklusjoner rundt effekt av denne vaksinen, i forhold til de tre andre.

Til tross for avgrensningene som har blitt foretatt i denne oppgaven, anser forfatterne at resultatene fra litteratursøket gir en reell oversikt over vaksinenes effekt og sikkerhet, utfordringer med forskningen og fremtidsutsikter.

Konklusjon

Denne litteraturgjennomgangen viser at det per i dag ikke er mulig å konkludere sikkert med effekt hos noen av de undersøkte vaksinene. For å muliggjøre dette, er det et behov for mer omfattende forskning, men det er mange utfordringer knyttet til slike høykvalitative studier. De krever store nok og standardiserte studieutvalg, som er kostbart og tidkrevende. Samtidig reiser bruken av privateide hunder en rekke etiske problemstillinger.

Det er mangler i dagens tradisjonelle behandlingsmetoder mot OMM og DLBCL, så behovet for utviklingen av nye alternativer er til stede. Uavhengig av effekt, virker det som at alle vaksinekomponentene har lite bivirkninger, og dette er positivt for videre utprøvning. Forskningen peker i retning av at kreftvaksiner skal bli et tilskudd til en multimodal behandlingsstrategi, med et håp om å bedre sluttresultat av behandlingen.

Utover kreftvaksinenes spennende fremtidsutsikter innen veterinærmedisin, vil det også kunne få en verdi for komparativ medisin.

Takk til bidragsytere

Vi ønsker å rette en stor takk til vår veileder Hanne Moberg for gode tilbakemeldinger, motivasjon og tett oppføling i forbindelse med oppgaveskrivingen.

Vi ønsker også å rette en takk til Idun Gundersen ved NMBU´s bibliotek for råd knyttet til metode og referering.

Summary

Title: A Review: The efficacy of cancer vaccines as a part of a multimodality treatment for canine melanoma and lymphoma – current status and future prospects

Author: Mina Bjone, Elin Maria Langeland

Supervisor: Hanne L. Moberg

Canine oral malignant melanoma (OMM) and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) are two malignant cancer forms with a poor prognosis. It has been demonstrated that the immune system plays a significant role in cancer development, and therefore, immunotherapy such as cancer vaccines holds great potential in cancer treatment.

This study is a literature review that has examined publications from the last 10 years, focusing on therapeutic cancer vaccines as part of a multimodal treatment regimen for OMM and DLBCL. The authors have reviewed the efficacy of Oncept, Anti-CSPG4, ApaVac, and Tel-eVax, and further evaluated the safety of their use, challenges associated with clinical trials, and future prospects.

As of now, it is not possible to conclusively determine the efficacy of any of the investigated vaccines. There is a need for more comprehensive research, but there are many challenges associated with such high-quality studies. They require sufficiently large and standardized study populations, which is costly and time-consuming. Additionally, the use of privately owned dogs raises several ethical issues.

Beyond the exciting prospects of cancer vaccines in veterinary medicine, they may also hold value for comparative medicine.

Referanser

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2016a). Antigen Capture and Presentation to Lymphocytes. I: *Basic Immunology*, s. 55-78. St. Louis Elsevier

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2016b). Hypersensitivity. I: *Basic Immunology* s. 231-247. St. Louis: Elsevier

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2016c). Immune Responses Against Tumors and Transplants I: *Basic Immunology* s. 211-230. St. Louis: Elsevier.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2016d). Immunological Tolerance and Autoimmunity I: *Basic Immunology*, s. 291-210. St. Louis: Elsevier

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2016e). Introduction to the Immune System I: *Basic Immunology* s. 1-25. St. Louis: Elsevier.

Atherton, M. J., Morris, J. S., McDermott, M. R. & Lichty, B. D. (2016). Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Vet Immunol Immunopathol*, 169: 15-26. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.11.003.

Aurisicchio, L. & Ciliberto, G. (2011). Emerging cancer vaccines: the promise of genetic vectors. *Cancers* 3(3): 3687-3713. doi: https://doi.org/10.3390/cancers3033687.

Bergman, P. J., Camps-Palau, M. A., McKnight, J. A., Leibman, N. F., Craft, D. M., Leung, C., Liao, J., Riviere, I., Sadelain, M., Hohenhaus, A. E., et al. (2006). Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine*, 24 (21): 4582-4585. doi: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.027.

Bergman, P. J. (2023). Cancer Immunotherapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. doi: 10.1016/j.cvsm.2023.12.002.

Berry, A., Hayes, A., Schiavo, L. & Dobson, J. (2022). Multimodal Treatment of a Canine Lingual Melanoma Using a Combination of Immunotherapy and a Tyrosine Kinase Inhibitors. *Veterinary Sciences*. doi: https://doi.org/10.17863/CAM.80862.

Boehringer Ingelheim. (u.å.). *ONCEPT®Canine Melanoma Vaccine, DNA*. Boehringer Ingelheim. Tilgjengelig fra: https://bi-animalhealth.com/pets/canine/products/therapeutics/oncept (lest 13.03.2024).

Boston, S. E., Lu, X., Culp, W. T., Montinaro, V., Romanelli, G., Dudley, R. M., Liptak, J. M., Mestrinho, L. A. & Buracco, P. (2014). Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001-2012). *J Am Vet Med Assoc*, 245 (4): 401-407. doi: https://doi.org/10.2460/javma.245.4.401.

Børresen-Dale, A.-L. (2022). *Autolog*. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/autolog (lest 21.01.2024).

Davey, M. G., Hynes, S. O., Kerin, M. J., Miller, N. & Lowery, A. J. (2021). Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers* 13 (17). doi: https://doi.org/10.3390/cancers13174455.

Day, M. J. & Schultz, R. D. (2014a). Cancer Immunology and Immune System Neoplasia. I: *Veterinary Immunology - Principles and Practice*, s. 166-180. London: Apple Academic Press Inc.

Day, M. J. & Schultz, R. D. (2014b). An overview of the immune system: Innate and adaptive immunity and the inflammatory response. I: *Veterinary Immunology - Principles and Practice*, s. 1-14. London: Apple Academic Press Inc.

Dias, J. N. R., André, A. S., Aguiar, S. I., Gil, S., Tavares, L. & Aires-da-Silva, F. (2021). Immunotherapeutic Strategies for Canine Lymphoma: Changing the Odds Against

Non-Hodgkin Lymphoma. *Frontiers in veterinary science*, 8: 621758-621758. doi: https://doi.org/10.3389/fvets.2021.621758.

Direktoratet for medisinske produkter. (u.å.). *Legemiddelsøk*. Tilgjengelig fra: https://www.legemiddelsok.no/ (lest 01.04.2024).

Dow, S. (2019). A Role for Dogs in Advancing Cancer Immunotherapy Research. *Front Immunol*, 10: 2935. doi: https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02935.

European Medicines Agency. (u.å.). *Medicines* Tilgjengelig fra: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/oncept-melanoma (lest 02.04.2024).

Finocchiaro, L. M., Fondello, C., Gil-Cardeza, M. L., Rossi Ú, A., Villaverde, M. S., Riveros, M. D. & Glikin, G. C. (2015). Cytokine-Enhanced Vaccine and Interferon-β plus Suicide Gene Therapy as Surgery Adjuvant Treatments for Spontaneous Canine Melanoma. *Hum Gene Ther*, 26 (6): 367-376. doi: https://doi.org/10.1089/hum.2014.130.

Gavazza, A., Lubas, G., Fridman, A., Peruzzi, D., Impellizeri, J. A., Luberto, L., Marra, E., Roscilli, G., Ciliberto, G. & Aurisicchio, L. (2013). Safety and efficacy of a genetic vaccine targeting Telomerase plus chemotherapy for the therapy of canine B-cell lymphoma. *Journal for immunotherapy of cancer*, 1: 212. doi: https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-S1-P212.

Giacobino, D., Camerino, M., Riccardo, F., Cavallo, F., Tarone, L., Martano, M., Dentini, A., Iussich, S., Lardone, E., Franci, P., et al. (2021). Difference in outcome between curative intent vs marginal excision as a first treatment in dogs with oral malignant melanoma and the impact of adjuvant CSPG4-DNA electrovaccination: A retrospective study on 155 cases. *Vet Comp Oncol*, 19 (4): 651-660. doi: https://doi.org/10.1111/vco.12690.

Glikin, G. C. & Finocchiaro, L. M. E. (2014). Clinical Trials of Immunogene Therapy for Spontaneous Tumors in Companion Animals. *ScientificWorldJournal*. doi: https://doi.org/10.1155/2014/718520.

Grosenbaugh, D. A., Leard, A. T., Bergman, P. J., Klein, M. K., Meleo, K., Susaneck, S., Hess, P. R., Jankowski, M. K., Jones, P. D., Leibman, N. F., et al. (2011). Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am J Vet Res*, 72 (12): 1631-1638. doi: https://doi.org/10.2460/ajvr.72.12.1631.

Hastim. (u.å.). *The advantages of APAVAC® treatment*. Hastim Tilgjengelig fra: https://www.hastim.fr/en/the-advantages-of-apavac-treatment (lest 22.01.24).

Helsebiblioteket. (2021). *Kunnskapsbasert praksis* Helsebiblioteket.no. Tilgjengelig fra: https://www.helsebiblioteket.no/innhold/artikler/kunnskapsbasert-praksis/kunnskapsbasertpraksis.no (lest 22.02.2024).

Impellizeri, J. A., Ciliberto, G. & Aurisicchio, L. (2014). Electro-gene-transfer as a new tool for cancer immunotherapy in animals. *Vet Comp Oncol*, 12 (4): 310-318. doi: https://doi.org/10.1111/vco.12006.

Impellizeri, J. A., Gavazza, A., Greissworth, E., Crispo, A., Montella, M., Ciliberto, G., Lubas, G. & Aurisicchio, L. (2018). Tel-eVax: a genetic vaccine targeting telomerase for treatment of canine lymphoma. *J Transl Med*, 16 (1): 349-349. doi: https://doi.org/10.1186/s12967-018-1738-6.

Kim, K. R., Kim, D. H., Jung, M. J., Sihn, D. M., Jeong, S. W. & Kim, J. H. (2023). Canine oral melanoma with suspected pulmonary metastasis: Combination of immunotherapy and tyrosine kinase inhibitor treatment. *Veterinární medicína*, 68 (12): 477-482. doi: https://doi.org/10.17221/90/2023-VETMED.

Kreftforeningen. (2023). *Immunterapi*. Tilgjengelig fra: https://kreftforeningen.no/om-kreft/behandling/immunterapi/ (lest 02.03.2024).
Kristensen, T. (2019). *Chaperoner - biokjemi*: Store norske leksikon,. Tilgjengelig fra: https://snl.no/chaperoner_-_biokjemi (lest 23.01.2024).
Marconato, L., Frayssinet, P., Rouquet, N., Comazzi, S., Leone, V. F., Laganga, P., Rossi, F., Vignoli, M., Pezzoli, L. & Aresu, L. (2014). Randomized, placebo-controlled, double-blinded chemoimmunotherapy clinical trial in a pet dog model of diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 20 (3): 668-677. doi: https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-13-2283.
Marconato, L., Martini, V., Stefanello, D., Moretti, P., Ferrari, R., Comazzi, S., Laganga, P., Riondato, F. & Aresu, L. (2015a). Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio as a useful prognostic factor in dogs with diffuse large B-cell lymphoma receiving chemoimmunotherapy. *Vet J*, 206 (2): 226-230. doi: https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.009.
Marconato, L., Stefanello, D., Sabattini, S., Comazzi, S., Riondato, F., Laganga, P., Frayssinet, P., Pizzoni, S., Rouquet, N. & Aresu, L. (2015b). Enhanced therapeutic effect of APAVAC immunotherapy in combination with dose-intense chemotherapy in dogs with advanced indolent B-cell lymphoma. *Vaccine*, 33 (39): 5080-6. doi: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.017.
Marconato, L., Aresu, L., Stefanello, D., Comazzi, S., Martini, V., Ferrari, R., Riondato, F., Rouquet, N., Frayssinet, P. & Sabattini, S. (2019). Opportunities and challenges of active immunotherapy in dogs with B-cell lymphoma: a 5-year experience in two veterinary oncology centers. *J Immunother Cancer*, 7 (1): 146-146. doi: https://doi.org/10.1186/s40425-019-0624-y.
McCarthy, E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*, 26: 154-158.
McLean, J. L. & Lobetti, R. G. (2015). Use of the melanoma vaccine in 38 dogs : the South African experience : original research. *Journal of the South African Veterinary Association*, 86 (1): 1-4. doi: https://doi.org/10.4102/jsava.v86i1.1246.
MSD Manual. (u.å.). *WHO Clinical Staging System for Lymphoma in Domestic Animals*. MSD Manual, Veterinary Manual. Tilgjengelig fra: https://www.msdvetmanual.com/multimedia/table/who-clinical-staging-system-for-lymphoma-in-domestic-animals (lest 15.01.2024).
Norsk Helseinformatikk. (2023). *Det erververde immunsystemet* NHI. Tilgjengelig fra: https://nhi.no/kroppen-var/funksjoner/immunsystemet-ervervet (lest 03.02.2024).
Ottnod, J. M., Rebecca, C. S., Walshaw, R., Joe, G. H., Matti, K. & Obradovich, J. E. (2013). A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma: Efficacy of Oncept melanoma vaccine. *Veterinary & comparative oncology*, 11: 219-229. doi: https://doi.org/10.1111/vco.12057.
Owen, L. N. (1980). *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen*. Geneva: World Health Organization. Tilgjengelig fra: https://iris.who.int/handle/10665/68618 (lest 06.05.2024).
Pazzi, P., Steenkamp, G. & Rixon, A. J. (2022). Treatment of Canine Oral Melanomas: A Critical Review of the Literature. *Vet Sci*, 9 (5): 196. doi: https://doi.org/10.3390/vetsci9050196.
Pellin, M. A. (2022). The Use of Oncept Melanoma Vaccine in Veterinary Patients: A Review of the Literature. *Veterinary sciences*, 9 (11): 597. doi: https://doi.org/10.3390/vetsci9110597.
Peruzzi, D., Gavazza, A., Mesiti, G., Lubas, G., Scarselli, E., Conforti, A., Bendtsen, C., Ciliberto, G., La Monica, N. & Aurisicchio, L. (2010). A Vaccine Targeting

Telomerase Enhances Survival of Dogs Affected by B-cell Lymphoma. *Molecular Therapy*, 18 (8): 1559-1567. doi: https://doi.org/10.1038/mt.2010.104.

Piras, L. A., Riccardo, F., Iussich, S., Maniscalco, L., Gattino, F., Martano, M., Morello, E., Lorda Mayayo, S., Rolih, V., Garavaglia, F., et al. (2017). Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen electrovaccination. *Vet Comp Oncol*, 15 (3): 996-1013. doi: https://doi.org/10.1111/vco.12239.

Regan, D., Guth, A., Coy, J. & Dow, S. (2016). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *Vet J*, 207: 20-28. doi: https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.008.

Riccardo, F., Iussich, S., Maniscalco, L., Lorda Mayayo, S., La Rosa, G., Arigoni, M., De Maria, R., Gattino, F., Lanzardo, S., Lardone, E., et al. (2014). CSPG4-specific immunity and survival prolongation in dogs with oral malignant melanoma immunized with human CSPG4 DNA. *Clin Cancer Res*, 20 (14): 3753-3762. doi: https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-13-3042.

Riccardo, F., Tarone, L., Camerino, M., Giacobino, D., Iussich, S., Barutello, G., Arigoni, M., Conti, L., Bolli, E., Quaglino, E., et al. (2022). Antigen mimicry as an effective strategy to induce CSPG4-targeted immunity in dogs with oral melanoma: a veterinary trial. *J Immunother Cancer*, 10 (5). doi: https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004007.

Sardesai, N. Y. & Weiner, D. B. (2011). Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol*, 23 (3): 421-429. doi: https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.008.

Smedley, R. C., Bongiovanni, L., Bacmeister, C., Clifford, C. A., Christensen, N., Dreyfus, J. M., Gary, J. M., Pavuk, A., Rowland, P. H., Swanson, C., et al. (2022). Diagnosis and histopathologic prognostication of canine melanocytic neoplasms: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Vet Comp Oncol*, 20 (4): 739-751. doi: https://doi.org/10.1111/vco.12827.

Tarone, L., Barutello, G., Iussich, S., Giacobino, D., Quaglino, E., Buracco, P., Cavallo, F. & Riccardo, F. (2019). Naturally occurring cancers in pet dogs as pre-clinical models for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 68 (11): 1839-1853. doi: https://doi.org/10.1007/s00262-019-02360-6.

Thamm, D. H. (2019). Novel Treatments for Lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 49 (5): 903-915. doi: https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.004.

Treggiari, E., Grant, J. P. & North, S. M. (2016). A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *J. Vet. Med. Sci.*, 78 (5): 845-850. doi: https://doi.org/10.1292/jvms.15-0510.

Turek, M., LaDue, T., Looper, J., Nagata, K., Shiomitsu, K., Keyerleber, M., Buchholz, J., Gieger, T. & Hetzel, S. (2020). Multimodality treatment including ONCEPT for canine oral melanoma: A retrospective analysis of 131 dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, 61 (4): 471-480. doi: https://doi.org/10.1111/vru.12860.

Vail, D. M., Thamm, D. H. & Liptak, J. M. (2020a). Cancer of the Gastrointestinal Tract. I: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, s. 432-491. Edinburgh: Elsevier.

Vail, D. M., Thamm, D. H. & Liptak, J. M. (2020b). Hematopoietic Tumors I: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, s. 688-772. Edinburgh: Elsevier.

Vail, D. M., Thamm, D. H. & Liptak, J. M. (2020c). Melanoma. I: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, s. 367-381. Edinburgh: Elsevier.

Verganti, S., Berlato, D., Blackwood, L., Amores-Fuster, I., Polton, G. A., Elders, R., Doyle, R., Taylor, A. & Murphy, S. (2017). Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine

oral malignant melanomas in the UK: Use of Oncept melanoma vaccine. *Journal of small animal practice*, 58 (1): 10-16. doi: https://doi.org/10.1111/jsap.12613.

Wen, V. W. & MacKenzie, K. L. (2013). Modeling human endothelial cell transformation in vascular neoplasias. *Dis Model Mech*, 6 (5): 1066-1079. doi: https://doi.org/10.1242/dmm.012674.

Zachary, J. F. (2017a). Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System. I: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, s. 724-804. St. Louis, Mo: Elsevier.

Zachary, J. F. (2017b). Neoplasia and Tumor Biology. I: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, s. 286-321. St. Louis, Mo: Elsevier.

Zuleger, C. L., Kang, C., Ranheim, E. A., Kurzman, I. D., Macklin, M. D., Newton, M. A., Wolchok, J. D., Vail, D. M., Eriksson, E. & Albertini, M. R. (2017). Pilot study of safety and feasibility of DNA microseeding for treatment of spontaneous canine melanoma. *Vet Med Sci*, 3 (3): 134-145. doi: https://doi.org/10.1002/vms3.65.

Aarnes, H. (2019). *Varmesjokkproteiner* Tilgjengelig fra: https://snl.no/varmesjokkproteiner (lest 20.02.2024).

Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no