



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap (BVF)

Immunterapi vid cancer

– är blockering av PD-1 en möjlig behandlingsmetod för hund?

Sofia Tengstrand

*Uppsala
2017*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2017:78

Immunterapi vid cancer – är blockering av PD-1 en möjlig behandlingsmetod för hund?

Cancer immunotherapy – is blocking PD-1 a possible treatment for dogs?

Sofia Tengstrand

Handledare: Magnus Åbrink och Caroline Fossum, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Examinator: Eva Tydén, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2017:78

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: cancer, immunterapi, PD-1, PD-L1, hund

Key words: cancer, immunotherapy, PD-1, PD-L1, dog

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt	3
<i>Aktivering av T-celler</i>	3
<i>PD-1:s utseende och funktion</i>	4
<i>Uttryck och funktion vid cancer</i>	5
<i>Immunterapi riktad mot PD-1</i>	6
<i>Biverkningar av behandlingen</i>	9
<i>Uttryck hos hundar med cancer</i>	9
Diskussion	11
Referenslista	15

SAMMANFATTNING

Programmed cell death protein 1 (PD-1) är en ko-inhiberande receptor som uttrycks på bland annat T-celler. Vid aktivering av T-celler leder interaktion mellan PD-1 och dess ligand, PD-L1, till att signalering från T-cellsreceptorn inhiberas och T-cellernas effektorfunktioner hämmas. Syftet med detta är att verka som en naturlig broms på immunförsvaret för att minska vävnadsskada vid pågående inflammation och autoimmunitet. Studier har visat att PD-1 och PD-L1 är uppreglerade vid cancer på T-celler respektive tumörceller och att det är en mekanism som hjälper tumörer att nedreglera immunsvaret riktade specifikt mot de neoplastiska cellerna.

Flertalet studier har utförts på humansidan där man inhiberat interaktion mellan PD-1 och PD-L1 genom blockerande antikroppar som binder till PD-1. Patienterna har lidit av avancerade cancerformer och har i vissa fall svarat oerhört bra på behandlingen. Syftet med den här litteraturstudien är att diskutera om de resultat som hittills framkommit på hund kan avgöra om det är en möjlig behandlingsmetod för det djurslaget. För och nackdelar som resistens mot behandlingen och immunrelaterade biverkningar som uppstår på grund av en generell immunologisk förstärkning diskuteras också. För att understödja diskussionen har även human forskning inom området granskats och presenterats.

PD-1 och PD-L1 är uppreglerat i flera olika cancerformer hos hund, och funktionerna vid interaktion mellan ligand och receptor samt blockering av PD-1 verkar ge samma effekt hos hund som hos människa. En logisk grund för att terapin borde fungera även på hund finns alltså. De studier som hittills gjorts på hund är dock samtliga gjorda in vitro och få till antalet. Därför kan inga slutsatser dras om effekterna in vivo. Dessutom finns det flera problem med behandlingen som biverkningar och den utbredda resistensen mot den. Det är även av stor vikt att hitta en bra prediktiv biomarkör som kan ange vilka patienter som kan svara på behandlingen. PD-L1 som kandidat för detta har undersökts i flera studier men även patienter som inte uttrycker PD-L1 svarar på behandlingen. Undersökningar av alternativa biomarkörer eller hur mätningarna av PD-L1-uttryck kan optimeras behövs.

SUMMARY

Programmed cell death protein 1 (PD-1) is a co-inhibiting molecule expressed on activated T-cells. When bound to its ligand, PD-L1, signaling from the T-cell receptor is inhibited and the T-cell is downregulated. The normal function of this interaction is to work as a brake on the adaptive immune system to prevent collateral tissue damage during inflammation and autoimmunity. Both PD-1 and PD-L1 is upregulated on T-cells and cancer cells respectively, and studies have shown that it's a mechanism for immune evasion by tumors.

Studies of antibodies blocking PD-1 have shown some remarkable results in humans with advanced forms of cancer. The aim of this review is to discuss whether this type of treatment could be an alternative for dogs with cancer as well. The results seen so far from studies in dogs are presented. Results and problems with the therapy, such as resistance and immune-related adverse events, in human clinical trials are also presented and discussed.

In dogs, PD-1 and PD-L1 is upregulated in many types of cancer. The effects of interaction between ligand and receptor and blocking of PD-1 seem to be the same as in humans. Based on that, dogs should be eligible candidates for treatment with blocking antibodies. However the number of studies investigating expression of PD-1 and PD-L1 in dogs is few and all done in vitro. To confirm effects of treatment, studies in vivo need to be conducted. There are also some problems with blocking of PD-1 that needs to be addressed. For example, both resistance to the treatment and adverse side effects are common among human patients. It's of great importance to find a predictive biomarker to be able to identify patients that will respond to the treatment. The expression of PD-L1 has been investigated in a lot of studies and has shown a positive correlation between expression on cancer cells and response to treatment. However, some patients that don't express PD-L1 also responded to the treatment. Investigations of alternative biomarkers or how to optimize the evaluation of PD-L1-expression thus needs to be conducted.

INLEDNING

Immunterapi är en behandlingsmetod som verkar genom att förstärka kroppens eget immunförsvar. Fältet har gjort stora genombrott de senaste åren som behandlingsmetod för cancer (Regan *et al.*, 2016). Grunden till att tumörceller kan väcka ett immunsvaret är den genetiska instabiliteten i tumörer samt epigenetiska förändringar, vilket påverkar tumörers antigenicitet. Då tumörceller skiljer sig från sina normala motsvarigheter kan de också kännas igen av immunceller. Dock har flera mekanismer upptäckts som gör att tumörceller kan undvika eller nedreglera immunförsvaret (Drake *et al.*, 2006).

Ett område inom immunterapi med spännande resultat på humansidan är inhiberingen av så kallade checkpointmolekyler vars roll är att minska aktiviteten hos immunceller. Programmed cell death 1 (PD-1) är ett exempel på en checkpointmolekyl som inhiberats med hjälp av blockerande antikroppar. Intresset för denna typ av behandlingsmetod växer även på veterinärsidan och studier för att se om det är en möjlig behandlingsmetod för cancer hos hund har initierats (Regan *et al.*, 2016).

Syftet med denna litteraturstudie är att ge en bakgrund till behandlingsmetoden genom att beskriva PD-1:s funktion och uttryck, redovisa resultat från kliniska studier på humansidan, samt att ta upp problematik med behandlingen. De resultat som hittills framkommit i studier på hundar redovisas också och diskuteras utifrån sannolikheten att denna behandlingsmetod kan tillämpas på hundar med cancer.

MATERIAL OCH METODER

Litteratur till studien erhöles genom sökningar i Pubmed och Web of science. Sökord som använts är immunotherapy AND (cancer OR neoplasm) AND (dog OR dogs OR canine), (PD1 OR PD-1 OR PDL-1 OR PDL1) AND (cancer OR neoplasm) AND immunotherapy, (PD1 OR PD-1 OR PDL-1 OR PDL1) AND (dog OR dogs OR canine) och PD1 AND (function OR action OR role OR operation). Referenser från vissa artiklar har också använts. Vid val av kliniska studier som inkluderats i denna litteraturstudie har fokus lagts på studier där flera olika cancertyper studerats och PD-1-blockerande antikroppar använts som monoterapi.

LITTERATURÖVERSIKT

Aktivering av T-celler

För att en T-cell ska aktiveras korrekt krävs det en antigenspecifik stimulering av dess T-cellsreceptor (TCR) samt ko-stimulation från antigenpresenterande celler (APC). Ko-stimulatoriska molekyler, till exempel CD154, CD28 och CD80, tillhör B7-familjen och uttrycks på både APC och T-celler. När T-celler bundit antigen induceras uttrycket av ko-stimulatoriska molekyler som vid interaktion får T-cellen att differentiera. Förutom ko-stimulatoriska molekyler finns det även ko-inhiberande receptorer som istället nedreglerar T-cellen. Dessa kallas för "immune checkpoints" och är viktiga för att kunna inhibera

självreaktiva T-celler som tagit sig förbi selektionen i thymus, en mekanism som kallas perifer tolerans.

CD4 uttrycks på T-hjälparceller och regulatoriska T-celler (Treg) och gör att de kan binda till MHC klass II. CD8 uttrycks på cytotoxiska T-celler (CTL) och Treg och gör att de kan binda till MHC klass I.

PD-1:s utseende och funktion

Programmed cell death protein 1, PD-1, är en "immune checkpoint receptor" som består av 288 aminosyror och uttrycks främst på ytan av aktiverade T-celler. Strukturellt byggs den upp av en extracellulär IgV-domän, en transmembrandel och en cytoplasmatisk del. IgV-domänen liknar den konserverade delen av den antigenbindande delen på antikroppar. Troligtvis uttrycks den som en monomer på cellytan. Den cytoplasmatiska delen innehåller ett "immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif" (ITIM) och ett "immunoreceptor tyrosine-based switch motif" (ITSM) som är essentiell för PD-1:s inhiberande funktion. PD-1 har två kända ligander, PD-L1 (B7-H1, CD274) och PD-L2 (B7-DC, CD273) (Bardhan *et al.*, 2016). PD-L1 kan även binda till CD80 på aktiverade T-celler och via den vägen inhibera T-cellsaktivering och produktionen av cytokiner (Sznol & Chen, 2013).

PD-1 uttrycks på aktiverade CD4⁺ och CD8⁺-T-celler, B-celler, monocyter, natural killer-cells (NK-celler) och dendritiska celler (DC). Interleukin 2 (IL-2), IL-7, IL-15 och IL-21 kan inducera uttryck av PD-1 på T-celler. PD-L1 kan uttryckas på flera olika immunceller som DC men även på flera icke-hematopoetiska celler som bland annat endotel, astrocyter, neuron, keratinocyter, cornea, syncytiotrofoblaster i placenta, i de langerhanska cellöarna och i lungorna. PD-L2 uttrycks på aktiverade DC, makrofager, benmärgsderiverade mastceller och mer än 50 % av peritoneala B1-celler. Interferon- γ (IFN- γ) kan reglera uttrycket av PD-L1 i icke-lymfatiska celler (Bardhan *et al.*, 2016).

PD-1-signalering är viktig för flera fysiologiska processer som utvecklandet av central och perifer tolerans, utveckling av tolerans för exogena antigen i områden som är immunprivilegerade och för att minska duration och omfattning av det normala adaptiva immunsvaret. Interaktion mellan receptor och ligand är även viktig vid placentabarriären genom att undertrycka inflammationssvar mot fostret (Folkl & Bienzle, 2010). PD-1 har som huvudsaklig funktion att minska aktiviteten hos T-celler perifert under inflammationssvar och att hämma autoimmunitet. Grunden för denna fysiologi är att liganderna PD-L1 och PD-L2 uppregleras som svar på proinflammatoriska cytokiner som IFN- γ och IL-4. Då PD-L1 kan induceras på många celltyper som endotel och epitelceller kan samtidigt uttryck av receptor och ligand leda till minskad kollateral vävnadsskada vid inflammation (Topalian *et al.*, 2012a).

Det är främst signalering vid interaktion mellan PD-1 och PD-L1 som har studerats. PD-1 kan enbart överföra signaler när TCR är bundet till antigen (Bardhan *et al.*, 2016). När PD-1 stimuleras fosforyleras ITIM och ITSM i den cytoplasmatiska delen vilket leder till rekrytering av Src homology 2-containing tyrosine phosphatase (Shp2). Shp2 defosforylerar

phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) vilket leder till att Akt (protein kinase B) inte aktiveras. Akt främjar T-cellsaktivering, proliferation och överlevnad. Signalering från PD-1 stoppar även signalering från TCR genom att blockera fosforylering av bland annat CD3 som är den signalerande komponenten i TCR. Resultatet av PD-1-stimulering blir därmed inducering av ett antiproliferativt och pro-apoptiskt tillstånd för T-cellen. Interaktion mellan PD-L2 och PD-1 har lett till både positiv och negativ ko-stimulering. Alla effekter som sker vid inbindande av PD-L1 och PD-L2 till PD-1 är ännu inte helt klarlagda (Folkl & Bienzle, 2010).

Vid sekvensering av hundens PD-1 gjordes en komparativ analys som visade 75,7 % likhet i aminosyrasekvens med människa. PD-L1 hade 86,2 % likhet i aminosyrasekvens med människa. Jämförelse av nukleotidsekvensen för PD-1 och PD-L1 mellan hundraserna samojed, labrador retriever, japansk akita, berner sennerhund och beagle visade 100 % likhet (Maekawa *et al.*, 2014).

Uttryck och funktion vid cancer

Vid cancer får de fysiologiska funktionerna hos PD-1-signalvägen en annan betydelse. Överuttryck av PD-L1 har setts hos ett antal solida och hematopoetiska tumörer som en mekanism för att störa immunsvaret mot tumörer. Tumörcellerna som uttrycker PD-L1 binder till PD-1 på T-celler, som i frånvaro av stark TCR-signalering och positiv ko-stimulering från aktiverade DC försätts i ett anergiskt tillstånd istället för att känna igen och döda de neoplastiska cellerna (Folkl & Bienzle, 2010). Detta sker genom att signalvägar i T-celler som är viktiga för överlevnad, expansion och differentiering inhiberas hos tumörantigen-specifika T-celler. Resultatet blir tumörtolerans genom att generering av effektor-T-celler och T-minnesceller hämmas. Istället bildas Tregs och utmattade T-celler (Bardhan *et al.*, 2016). En jämförelse av fenotyp hos tumörinfiltrerande lymfocyter (TIL) jämfört med T-celler från normal vävnad hos 8 humanpatienter med metastaserande melanom visade en övergripande uppreglering av markörer associerade med utmattning (exhaustion) hos PD-1⁺ TILs. Tester visade även att deras effektorfunktioner var nedsatta (Ahmadzadeh *et al.*, 2009). Vid behandling med en PD-1-blockerande antikropp hos 25 humanpatienter med avancerat (metastaserat eller inoperabelt) melanom skedde en ökning av CD8⁺ T-celler, både där invasion skett och i tumörparenkymet hos grupper som svarade på behandling. Detta tyder på att proliferation och infiltration skett av de T-celler där interaktion mellan PD-1 och PD-L1 hämmats. En signifikant korrelation syntes också mellan minskning av tumörstorlek och en ökning av T-cellsdensitet i biopsier efter behandling (Tumeh *et al.*, 2014).

Uttrycket av PD-L1 på tumörceller kan styras av flera mekanismer. När tumörantigen-specifika T-celler känner igen antigen som uttrycks av cancerceller kommer signalering via TCR att leda till produktion av interferoner. Uttryck av aktiveringsinducerade regulatoriska receptorer som PD-1 stimuleras också. Interferonernas syfte är bland annat att amplifiera immunsvaret och attrahera andra leukocyter, men de leder även till uttryck av flera interferoninducerbara immunosuppressiva faktorer som PD-L1. Detta är en adaptiv process som normalt används för att minska inflammatoriska svar och cancer använder den till sin fördel. PD-L1 kan också uttryckas via olika onkogena signalvägar men dessa är inte ordentligt

utredda i nuläget. Interferoninducerat uttryck av PD-L1 stimuleras vid aktiva immunsvaret mot tumören och resulterar i ett avgränsat uttryck av PD-L1 i T-cellsrika områden i tumören, särskilt där infiltrationen skett (Ribas 2015).

In vitro-studier har visat uttryck av PD-L1 i lungkarcinom, äggstockskarcinom, kolonkarcinom och melanom. Uttrycket var ofta fokalt utan uttryck i angränsande normal vävnad. Vid tillsats av T-celler till en tumörcellinje som uttryckte PD-L1 genomgick fler T-celler apoptos än i de cellinjer som inte uttryckte PD-L1. Noterbart är dock att i ett av dessa försök använde man sig av T-celler som inte uttryckte PD-1 men ändå genomgick apoptos vilket indikerar att PD-L1 även kan inducera apoptotiska signaler via en annan receptor (Dong *et al.*, 2002).

Immunterapi riktad mot PD-1

Eftersom uttryck av PD-L1 är ökat hos vissa cancerformer och interaktion med PD-1 leder till suppression av T-celler, så är det logiskt att blockering av PD-1 bör kunna inhibera de bromsande mekanismer som PD-1-signaler skapar. Då bör också ett immunsvaret mot cancer kunna stimuleras. Flera kliniska försök på humansidan har gjorts med olika blockerande antikroppar i just detta syfte. Svar på behandlingen har i studierna bedömts enligt de krav som återfinns i Response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) 1.0 (Brahmer *et al.*, 2010, Topalian *et al.*, 2012b) respektive 1.1 (Patnaik *et al.*, 2015). Aktuella kriterier redovisas i tabell 1.

Tabell 1. Sammanställning av responskriterier enligt RECIST 1.0 och 1.1 (utvalda delar) (Eisenhauer *et al.*, 2009)

Komplett respons	Alla mål-lesioner* har försvunnit
Partiell respons	Minskning på minst 30 % av summan av diametern hos alla mål-lesioner från första mätning
Sjukdomsprogression	Minst 20 % ökning av summan av diametern hos alla mål-lesioner jämfört med den minsta uppmätta summan av detta värde (måste även vara minst 5 mm enligt version 1.1). Förekomst av nya lesioner bedöms också som progression
Stabil sjukdom	Varken tillräcklig minskning eller ökning för att bedömas som något av ovanstående. Referens är den minsta summan av diametern hos alla mål-lesioner under studietiden

* Mål-lesioner är de lesioner som mäts för att jämföra skillnad under behandling om patienten har mer än en lesion. Enligt RECIST 1.0 maximalt 10 lesioner (varav maximalt 5 per organ), enligt RECIST 1.1 maximalt 5 lesioner totalt (varav maximalt 2 per organ)

Blockering av PD-1 med antikroppen MDX-1106 (senare kallad nivolumab) utfördes på 39 patienter med svårbehandlade, solida tumörer i en fas 1-studie. Svar på behandlingen sågs hos 1 patient med kolorektalcancer som fick en komplett respons som varade i 21+ månader och 2 patienter upplevde partiella responser, en med melanom och en med njurcellscancer. Dessa svar varade i 3 respektive 16 månader. En allvarlig biverkning (kolit) observerades hos en patient med melanom som fick 5 doser på 1 mg/kg. Övriga patienter svarade inte på

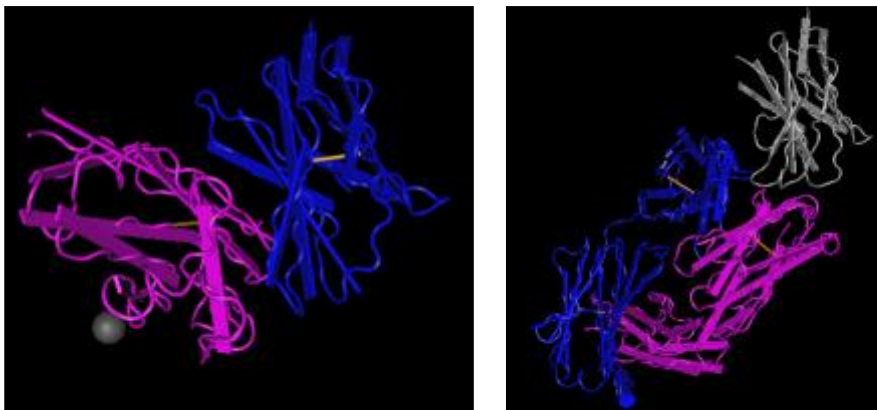
behandlingen eller nådde inte de positiva kriterierna för respons enligt RECIST 1.0 (Brahmer *et al.*, 2010). En långvarig uppföljning av de 3 patienter som svarade på behandlingen gjordes i en annan studie, där man följde dem i tre år efter att immunterapi avslutats. Den kompletta respons som patienten med kolorektalcancer upplevde fortsatte i tre år utan några tecken på återfall. Patienten med njurcellscancer fick en partiell respons som övergick till en komplett respons utan terapi och som är pågående vid 12 månader. Den partiella respons som patienten med melanom upplevde var stabil i 16 månader utan terapi men patienten fick sedan ett återfall. Behandlingen sattes in igen och när artikeln skrevs hade patienten en partiell respons som varat i 16 månader (Lipson *et al.*, 2013).

Ytterligare en fas 1-studie av MDX-1106 utfördes på patienter med avancerade, solida tumörer där behandling pågick i upp till två år. I studien deltog 296 patienter varav resultat kunde bedömas hos 236 stycken. Antitumöraktivitet observerades på alla testade doser. I denna studie angavs resultat som enbart svar på behandlingen, där både partiell och komplett respons ingår. Hos patienter med icke-småcellig lungcancer såg man svar på behandlingen hos 14 patienter. Även 26 patienter med melanom och 9 patienter med njurcellscancer svarade på behandlingen. Av de patienter som startat behandlingen ett år eller mer innan analys av data var det 2 av 5 patienter med icke-småcellig lungcancer, 13 av 18 melanompatienter och 5 av 8 patienter med njurcellscancer som hade svar som varade i ett år eller mer. Man såg inga svar hos patienter med kolorektalcancer eller prostatacancer. Totalt 15 av 296 patienter avslutade behandlingen på grund av behandlingsrelaterade biverkningar och 62 patienter avled under studietiden. Den vanligaste dödsorsaken var att sjukdomen förvärrades. De vanligaste behandlingsrelaterade biverkningarna var trötthet, utslag, diarré, pruritus, minskad aptit och illamående. Behandlingsrelaterade biverkningar av grad 3 eller 4 på en femgradig skala observerades hos 41 av 296 patienter. Av dessa var 32 allvarliga vilket enligt definition i studien bland annat innefattade livshotande biverkningar eller de som krävde sjukhusvård eller medicinering. Frekvens och svårighetsgrad av biverkningarna var generellt liknande över olika dosnivåer. Biverkningar hanterades med hjälp av avbruten behandling och glukokortikoider om nödvändigt. Pneumoni på grund av behandlingen resulterade i att 3 av totalt 9 drabbade patienter avled (Topalian *et al.*, 2012b).

Pembrolizumab är en annan PD-1-blockerande antikropp som studerats. En studie av totalt 30 patienter med avancerade, solida tumörer utfördes där antitumöraktivitet observerades vid alla testade doser och doseringsscheman. Kompletta responser sågs hos 2 patienter, en med melanom och en med Merkelcellskarcinom, som varade i 57 respektive 90+ veckor. Ytterligare 3 patienter med melanom fick en partiell respons på behandlingen. Ett av dessa fall var en partiell respons som varade i 24 veckor och sedan övergick i stabil sjukdom. De andra 2 patienterna avslutade behandlingen, en på grund av hjärtinfarkt som inte ansågs relaterad till behandlingen och den andra på grund av viktnedgång som möjligtvis ansågs relaterad till behandlingen. Denna patient utvecklade gastrit och behandlades med kortikosteroider. Patienten dog 92 dagar efter att immunterapi avslutats på grund av kryptokockinfektion. Durationen för dessa svar på behandlingen var 16 veckor innan bortfall från studien respektive 26 veckor. Behandlingsrelaterade biverkningar förekom hos 21 patienter men inga var av grad 3 eller 4. Dock fick 3 patienter avsluta behandlingen på grund av biverkningarna trötthet, pneumoni och viktnedgång. En av dessa patienter dog senare av

kardiovaskulär sjukdom som inte ansågs relaterad till behandling och hade då haft ett pågående svar på behandlingen i 57 veckor. Hos övriga patienter var bästa responsen stabil sjukdom. Immunrelaterade biverkningar förekom hos 5 patienter. Dessa var grad 1 trötthet, erytem och hypothyroidism och grad 2 gastrit och pneumoni (Patnaik *et al.*, 2015).

Pembrolizumab godkändes senare för användning mot avancerat melanom av U.S. Food and Drug administration 2014. Även nivolumab godkändes kort därefter (Littman 2015). Nyligen godkändes även en PD-L1-blockerande antikropp, atezolizumab, i USA (Coy *et al.*, 2017). Godkända indikationer för pembrolizumab (läkemedelsnamn Keytruda) på humansidan är avancerat malignt melanom och metastaserande icke-småcellig lungcancer. Behandling av icke-småcellig lungcancer ska baseras på tumörens uttryck av PD-L1 påvisat med en validerad metod. Läkemedlet administreras som intravenös infusion under 30 minuter var tredje vecka. Behandling bör fortsätta tills sjukdomsprogression eller oacceptabel toxicitet inträffar (Läkemedelsindustriföreningen, 2017a). Godkända indikationer för nivolumab (läkemedelsnamn Opdivo) på humansidan är avancerat melanom, icke-småcellig lungcancer, njurcellscancer och klassiskt Hodgkins lymfom. Rekommenderad dos som monoterapi är 3 mg/kg som administreras intravenöst under 60 minuter varannan vecka. Behandling bör fortsätta så länge en klinisk nytta ses eller tills behandling inte längre tolereras av patienten (Läkemedelsindustriföreningen, 2017b). Jämförelse mellan hur PD-1 binder in till PD-L1 och nivolumab visas i figur 1 a respektive 1 b.



Figur 1 a till vänster visar hur PD-1 (blå) binder in till sin ligand PD-L1 (rosa). Figur 1 b till höger visar hur den antigenbindande delen av nivolumab (blå och rosa) binder till PD-1 (grå), vilket blockerar möjlighet till interaktion mellan PD-1 och PD-L1. Bilderna är hämtade från NCBI:s strukturwebsida och skapade med hjälp av programmet Cn3D (Madej *et al.*, 2014).

PD-L1 som potentiell prediktiv biomarkör för svar på behandlingen har också undersökts i dessa studier. I Brahmer *et al.*'s studie undersöktes cellyteuttryck hos 9 patienter varav 4 hade positivt uttryck och av dessa svarade 3 på behandlingen (Brahmer *et al.*, 2010). 42 patienter analyserades för uttryck av PD-L1 i Topalian *et al.*'s studie varav 25 bedömdes som positiva. 9 av dessa svarade på behandlingen (Topalian *et al.*, 2012b). PD-L1-uttryck bedömdes hos 14 patienter där de 2 som var positiva för uttryck upplevde partiella responser i Patnaik *et al.*'s studie (Patnaik *et al.*, 2015).

Biverkningar av behandlingen

Blockering av immune checkpoints tar inte bara bort blockeringen av tumörspecifika immunsvar utan immunrelaterade biverkningar (immune-related adverse events, irAEs) uppstår även i vissa fall, troligtvis på grund av en generell immunologisk förstärkning. Temporär immunosuppression med kortikosteroider kan därför ibland vara nödvändigt. Tidig upptäckt och behandling tros vara viktigt för att minska svårighetsgraden (Postow *et al.*, 2015). Analys av fas 1-3 studier med nivolumab visade att 35 % av patienterna behövde behandlas med immunmodulerande läkemedel och att dessa irAEs var behandlingsbara i nästan alla fall. Flertalet kliniska studier har visat att systemisk behandling med kortikosteroider inte försämrar effekten av immunterapi. Detta stöds av in vitro-experiment och musmodeller. Dock är data från specifikt PD-1-blockerande antikroppar begränsad på detta område (Day & Hansen, 2016).

Den vanligaste irAE är dermatologisk toxicitet med olika utslag men den kanske mest kliniskt relevanta irAEn är diarré eller kolit. Endokrinopatier som påverkar hypofysen, binjure och thyroidea har också observerats men den exakta incidensen är svår att bedöma eftersom de bevakats i varierande grad i kliniska försök. De kliniska symtomen varierar men är ofta ospecifika som trötthet, huvudvärk och illamående (Postow *et al.*, 2015). I stora, kliniska studier har andelen patienter som upplevt behandlingsrelaterade biverkningar legat på 70-80 %, där de vanligaste biverkningarna varit trötthet, diarré, utslag och pruritus (Day & Hansen, 2016).

Uttryck hos hundar med cancer

Flera studier har undersökt uttrycket av PD-L1 och PD-1 hos hundar. En in vitro-studie av 31 tumörcellinjer från olika tumörtyper visade uttryck av PD-L1 på cellytan hos vissa linjer med celler från melanom, osteosarkom, mastcellstumörer och lymfom. Stimulering med IFN- γ inducerade membranuttryck av PD-L1 hos samtliga cellinjer, även de som inte tidigare uttryckt PD-L1, utom lymfomen. Analys med hjälp av immunohistokemi av tumörvävnadsprov visade att en rad olika tumörtyper uttryckte PD-L1. Fullständiga resultat redovisas i tabell 2 (Shosu *et al.*, 2016).

Ytterligare en in vitro-studie visade uttryck av PD-L1 i 2 tumörcellinjer från mastocytom. IFN- γ kunde inducera uttryck av PD-L1 i alla testade melanomlinjer (totalt 4) men inte i de 2 cellinjer från osteosarkom. Flödescytometri utfördes på tumörvävnadsprover från angiosarkom, hepatocellulärt karcinom, skivepitelcancer och juvertumör (ett från respektive tumörtyp) och alla uttryckte PD-L1. Histologisk undersökning visade uttryck av PD-L1 hos flera olika tumörer, resultaten är redovisade i tabell 3 (Maekawa *et al.*, 2014). I en senare studie av samma huvudförfattare visades uttryck av PD-L1 hos 36 av 40 orala melanom, 7 av 10 osteosarkom, 6 av 10 hemangiosarkom, 3 av 5 mastcellstumörer, 4 av 5 juvertumörer och 3 av 5 prostatatumörer. Både uttryck på cellytan och i cytoplasman observerades. Vissa testade tumörtyper bedömdes som negativa för uttryck i samtliga prover. Alla testade tumörer var maligna (Maekawa *et al.*, 2016).

Tabell 2. Sammanställning av resultat från tumörvävnadsprover (Shosu *et al.*, 2016)

Tumörtyp	Antal prover	Uttryck av PD-L1
Malignt lymfom	15	15
Malignt melanom	15	11
Juvertumör	15	10
Mastcellstumör	13	11
Malignt fibröst histiocytom	8	6
Fibrosarkom	6	4
Hemangiosarkom	11	2
Malign nervskidetumör	11	4
Hemangiopericytom	10	4
Osteosarkom	3	0

Tabell 3. Sammanställning av resultat från tumörvävnadsprover (Maekawa *et al.*, 2014)

Tumörtyp	Antal prover	Uttryck av PD-L1
Mastocytom	6	4
Njurcellscancer	10	7
Melanom (totalt)	13	9
- öga	2	0
- hud	3	1
- oral	8	8

En nyligen publicerad studie undersökte uttryck av PD-1 på T-celler från 31 hundar som diagnostiserats med olika typer av cancer. Vid jämförelse med friska kontroller såg man att uttrycket var högre både på CD4⁺-T-celler (11 % jämfört med 7 %) och CD8⁺-T-celler (30 % jämfört med 22 %) hos hundarna med cancer. Skillnaden var statistiskt signifikant för CD4⁺-T-celler men ej för CD8⁺-T-celler (Coy *et al.*, 2017). En annan studie visade att uttrycket av PD-1 på tumörinfiltrerande lymfocyter (TIL) hos hundar med oralt melanom var högre jämfört med lymfocyter från friska kontrollhundar (70,9-96,6 % för CD8⁺-T-celler och 80,2-96,8 % för CD4⁺-T-celler). Jämförelse mellan TILs och normala vävnadsinfiltrerande lymfocyter, där båda proverna togs från samma hund, visade också att uttrycket av PD-1 var högre hos TILs. Detta undersöktes hos patienter med hepatocellulärt adenom respektive adenokarcinom (Maekawa *et al.*, 2016).

När det gäller blockering av PD-1-signalering har en *in vitro*-studie visat att blockerande antikroppar, specifikt riktade mot hund-PD-1 kunde stoppa den suppression som PD-L1 orsakade hos T-celler från friska hundar. En tumörcellinje från malignt histiosarkom med stort uttryck av PD-L1 supprimerade tillsatta T-celler. Denna effekt blev signifikant men ej komplett omvänd vid tillsats av PD-1-blockerande antikroppar. Samma resultat visades när T-celler odlades tillsammans med tumörfragment från olika, nyligen urtagna tumörvävnader (Coy *et al.*, 2017). Effekt på cytokinproduktionen hos T-celler vid blockering av PD-1-

signalering med hjälp av blockerande antikroppar riktade mot PD-L1 har också undersökts. Lymfocyter från friska hundar odlade med den blockerande antikroppen fick en ökad IFN- γ -produktion jämfört med kontroller. Man testade också att tillsätta antikropparna i cellkulturer från 3 olika tumörtyper och såg att IFN- γ -produktionen ökade hos de infiltrerande lymfocyterna från 2 av tumörtyperna (hepatocellulärt karcinom och myelolipom) (Maekawa *et al.*, 2014).

DISKUSSION

Uttryck av PD-L1 har visats i flera olika tumörvävnader från hundar och uttrycket gick att inducera med IFN- γ . Uttryck av PD-1 på T-celler har också bevisats samt att uttrycket var högre på TILs hos hundar med oralt melanom, hepatocellulärt adenom och hepatocellulärt adenokarcinom (Maekawa *et al.*, 2016). Eftersom uttrycket observerats vid cancer, både av PD-1 och PD-L1, är det logiskt att anta att interaktion mellan dessa är en mekanism som nedreglerar immunsvaret specifika mot tumören även hos hundar. Vid *in vitro*-studier har blockering av PD-1 med en hundspecifik antikropp kunnat signifikant, men ej komplett, stoppa den suppression som PD-L1-stimulering gav i tumörprover (Coy *et al.*, 2017). IFN- γ -produktion ökade även vid tillsats av blockerande antikroppar för 2 av 3 tumörtyper (Maekawa *et al.*, 2014). Detta visar att en blockerande antikropp delvis och i vissa fall kan hämma den nedreglerande effekt som PD-1-signalering resulterar i även hos hundar. Baserat på dessa resultat bör alltså blockerande antikroppar fungera som behandlingsmetod. Vilka cancerformer som skulle kunna vara aktuella att behandla är svårt att säga på grund av att så många olika cancerformer undersökts och i så få antal prover och studier. Den cancerform som haft uttryck i flest antal prov är oralt melanom och skulle därför eventuellt kunna vara en kandidat.

Något som är viktigt att tänka på är dock att alla dessa resultat baseras på väldigt få studier och att testerna utförts *in vitro*. Inga kliniska försök har ännu gjorts på hundar så man kan inte enbart på de resultat som studierna visar garantera att dessa effekter ses *in vivo*, då det är väldigt många fler faktorer som spelar in i kroppen jämfört med på ett laboratorium. Resultaten visar snarare att inga hinder har hittats för att inte fortsätta undersöka om det kan vara en möjlig behandlingsmetod på hund. Resultat av blockering av PD-1, baserat på dessa fyra studier, kan förväntas likna de på humansidan men fler försök behöver göras, särskilt *in vivo*, för att kunna säga något säkert.

Vad som också behöver adresseras är om immunterapin hittills visat tillräckligt bra resultat för att användas på hundar. PD-1-blockerande antikroppar har onekligen gett några fantastiska resultat på humansidan. Patienterna i studierna som presenterats tidigare i denna litteraturstudie lider alla av avancerade cancerformer och har i många fall behandlats med en eller flera andra terapiformer innan. Trots detta har blockering av PD-1 som monoterapi kunnat ge både kompletta och partiella responser eller sjukdomsstabilisering hos flera patienter, vilket förklarar den entusiasm för terapin som just nu råder. Frågan är dock om enbart förlängd livslängd med sjukdomsstabilisering eller partiella responser är ett tillräckligt bra svar på behandlingen? Förutsätter man att patienterna på veterinärsidan skulle vara motsvarande de på humansidan är det hundar som lider av allvarliga cancerformer som

kommer att behandlas. Så pass allvarliga sjukdomar involverar troligtvis även en stor grad av lidande. Är det då rätt att sätta in en terapi med förvisso fantastiska resultat i vissa fall, men även en stor andel som inte svarar på behandling? Biverkningar, både immunrelaterade och övriga, är också relativt vanligt och det är brist på undersökningar om livskvalitet under behandling på humansidan vilket är något som Day och Hansen diskuterar (Day & Hansen, 2016). Eftersom varje fall av cancer är unikt är detta dock svåra frågor att svara på då de ofta bör dömas efter varje individuellt fall. Dessutom skulle resultat från studier av mindre svåra cancerformer behöva vägas in i bedömningen.

Det finns även många frågetecken kring behandlingen som behöver rätas ut. Till exempel exakt vad som inducerar uttrycket av PD-1 utöver aktivering. Långt ifrån alla T-celler uttrycker PD-1 och spannet hos humana cancerpatienter är väldigt stort. Hos 28 patienter med avancerat melanom uttryckte TILs PD-1 men i väldigt varierande grad (9,8-71,8 % hos CD4⁺ och 12,9-91,2 % för CD8⁺). Resultaten visade dock att TILs uttryckte högre nivåer av PD-1 jämfört med cirkulerande T-celler hos samma patient (studerat hos 14 patienter), vilket gällde både CD4⁺ och CD8⁺. Uttrycket av PD-1 hos tumörantigenspecifika T-celler hos 3 patienter visade sig även vara högre hos de T-celler som infiltrerat tumören, jämfört med de cirkulerande (Ahmadzadeh *et al.*, 2009). En annan studie har visat att "special AT-rich sequence-binding protein-1" (Satb1) hindrar uttrycket av PD-1 som induceras vid aktivering. Resultaten visade också att "transforming growth factor- β " (TGF- β), en immunosuppressiv cytokin som finns i tumörers mikromiljö, minskade nivåerna av Satb1 och därmed den blockering av PD-1-uttryck som den utgör (Stephen *et al.*, 2017). Vilka cytokiner som finns i tumörernas mikromiljö skulle alltså kunna påverka uttrycket av PD-1. Exakt vilka mekanismer som styr uttrycket är nödvändigt att veta för att hitta de patienter där terapin kan vara verksamt, det vill säga de som har en nedreglering av specifika tumörimmunsvar på grund av PD-1 och PD-L1-interaktion. Fler studier skulle behöva undersöka sambandet mellan svar på behandlingsmetoden och uttryck av PD-1 på T-celler för att klargöra dess betydelse. Alla resultat som interaktion med PD-L1 och PD-L2 resulterar i är inte heller helt klarlagda. Dessutom kan PD-L1 interagera med en annan receptor och ge inhiberande verkan. Vilka mekanismer och interaktioner som specifikt inhiberas med de PD-1-blockerande antikropparna skulle behöva utredas mer.

Utbredd resistens förekommer också mot behandlingen då långt ifrån alla patienter upplever någon förbättring eller stabilisering. Potentiella orsaker till resistensen har diskuterats, bland annat tumörers antigenicitet, upptäckta mekanismer som stör antigenpresentation, att cytokinmiljön i vissa tumörer kan påverka mognaden av DCs och att vissa tumörer använder flera immunosuppressiva signalvägar som är oberoende av PD-1. Även tumörers uppbyggnad i form av struktur och celldensitet och deras lokalisering har visats ha betydelse för känslighet mot behandlingen, då det påverkar distributionen av läkemedlet till dess verkningsplats (O'Donnell *et al.*, 2017). Varför de som svarar på behandling gör det, och hur deras tumörers uppbyggnad och mikromiljö ser ut är av stor vikt att reda ut.

Att så olika resultat uppnås i kliniska studier visar också på hur viktigt det är att hitta prediktiva biomarkörer för att kunna avgöra vilka patienter som kan svara på behandlingen. I studierna som presenteras i denna litteraturstudie har uttrycket av PD-L1 undersökts via

immunohistokemi för att avgöra om det kan vara en aktuell kandidat. I två studier visas en positiv korrelation (Brahmer *et al.*, 2010, Patnaik *et al.*, 2015). I den tredje studien där uttrycket undersöktes har förvisso 9 av de 25 patienter som bedömdes som positiva svarat på behandlingen, men de övriga 16 svarade inte (Topalian *et al.*, 2012b). Dessa resultat är utförda på ett fåtal patienter och bör därför tolkas med försiktighet, vilket även nämns i studierna, men visar ändå på de motstridiga resultat som förekommer. Metaanalys har visat att överuttryck av PD-L1 är signifikant associerat med bättre svar på PD-1 eller PD-L1-blockad. Dock har ett signifikant antal patienter med väldigt lågt eller inget uttryck av PD-L1 också svarat på behandling (Meng *et al.*, 2015). Resultaten i flera studier bör dock tolkas med försiktighet på grund av bristen på specificitet hos vissa kommersiellt tillgängliga antikroppar mot PD-L1, att enbart uttryck på ytan bör bedömas och svårigheten i att utveckla metoder för detektion i formalinfixerad och paraffinbäddad vävnad hävdar Sznol & Chen (Sznol & Chen, 2013). Andra problem med PD-L1 som biomarkör är att uttrycket av PD-L1 är dynamiskt så utvärdering vid en enskild tidpunkt säger inte så mycket om hur uttrycket kan utvecklas över tid. Uttrycket varierar även mellan primära tumörer och metastaser, även hos samma patient. Användandet av olika antikroppar och olika färgningstekniker kan ge olika resultat. Dessutom använder sig olika studier av olika gränsvärden för vad som ska bedömas som ett positivt uttryck (Meng *et al.*, 2015). Trots bristerna är PD-L1 nog den mest välundersökta biomarkören och den är viktig med tanke på att samband setts. Behandling av icke-småcellig lungcancer med pembrolizumab ska bedömas efter just uttrycket av PD-L1 (Läkemedelsindustriföreningen, 2017a). Dock skulle mer forskning kring PD-L1 behöva utföras för att kunna avgöra om det är en bra biomarkör med tanke på att vissa som inte uttryckt liganden svarar på behandling och tvärtom. Undersökningar av vilken metod som är bäst för att bedöma uttrycket, vilken antikropp man ska använda sig av och om den bör baseras på flera snitt från olika tidpunkter behöver också utföras för att kunna avgöra om PD-L1 är den bästa biomarkören eller om bättre alternativ finns.

En studie som jämförde densitet av CD8⁺-, CD4⁺-, PD-1⁺- och PD-L1⁺-celler kom fram till att den bästa prediktiva markören hos patienter med avancerat melanom var densitet av CD8⁺ T-celler vid invasionsområdet. Slutsatsen av studien blev att densitet innan behandling och lokalisering av T-celler i metastaserande melanom har prediktivt värde för behandlingsresultat (Tumeh *et al.*, 2014). Denna studie är förvisso utförd på enbart en specifik cancerform men visar ändå på värdet av att undersöka alternativa biomarkörer.

Andra problem med blockering av PD-1 är att andelen patienter som upplever biverkningar på humansidan är stor. De har i vissa fall varit så allvarliga att de lett till dödsfall vilket visar på vikten av övervakning av patienter behandlade med denna form av terapi. Även övervakning av opportunistiska infektioner som kan få fäste vid behandling med immunsupprimerande medel är viktig, då det fått en så allvarlig konsekvens som dödsfall i en studie (Patnaik *et al.*, 2015). Dock är många av biverkningarna hanterbara och kan botas med hjälp av avbruten behandling eller immunosuppressiva medel. Risken att utveckla immunrelaterade biverkningar, irAEs, på grund av behandling med PD-1-blockerande antikroppar är något som behöver undersökas. Inga konsekventa samband mellan dos och toxicitet för läkemedlet har setts i kliniska studier (Day & Hansen, 2016). Detta är intressant då toxiciteten snarare verkar avgöras av varje enskilt fall. Sambandet mellan varför vissa patienter utvecklar biverkningar

och vilka som blir mer allvarliga skulle behöva utredas bättre för att eventuellt kunna hitta riskgrupper som inte bör behandlas. Day och Hansen tar även upp att indelningen mellan immunrelaterade biverkningar (irAEs) och icke-immunrelaterade är problematisk då denna indelning är dåligt definierad.

Kombinationsterapier skulle eventuellt kunna vara en lösning på toxicitetsprofilen, men eftersom inget tydligt samband setts mellan dos och toxicitet är det oklart om det skulle ha någon effekt. Kombinationsterapier skulle eventuellt också kunna lösa viss resistensproblematik. Flera försök med kombination av PD-1-blockerande antikroppar och andra terapier har utförts eller pågår, dock är det inget som diskuteras i denna litteraturstudie. Bättre kunskap om varför biverkningarna uppstår och om olika doser eller doseringsscheman påverkar hur svåra de blir behövs för att kunna bedöma detta. Även undersökningar av hur livskvalitén påverkas under behandling för att kunna avgöra om nyttan med behandlingen överväger de negativa effekterna.

Sammanfattningsvis kan man konstatera att de resultat som hittills setts på hund är lovande men att inga garantier för klinisk effekt kan dras av dessa. Behandlingsmetoden har även brister som skulle behöva förbättras innan den tillämpas på hundar i och med att behandlingsläget på veterinärsidan ser annorlunda ut, då man kan välja att avsluta ett liv istället för att utsätta djuret för onödigt lidande. Vilka prediktiva biomarkörer som är bäst för att hitta patienter som kommer att svara på behandlingen och varför resistens mot behandlingen uppstår behöver utredas vidare. PD-1-blockering är dock en relativt ny behandlingsmetod för cancer så det finns stor utvecklingspotential inom området.

REFERENSLISTA

- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E. & Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537-1544.
- Bardhan, K., Anagnostou, T. & Boussiotis, V.A. (2016). The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical implementation. *Frontiers in Immunology*, 7.
- Brahmer, J.R., Drake, C.G., Wollner, I., Powderly, J.D., Picus, J., Sharfman, W.H., Stankevich, E., Pons, A., Salay, T.M., McMiller, T.L., Gilson, M.M., Wang, C., Selby, M., Taube, J.M., Anders, R., Chen, L., Korman, A.J., Pardoll, D.M., Lowy, I. & Topalian, S.L. (2010). Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. *Journal of Clinical Oncology*, 28(19), 3167-3175.
- Coy, J., Caldwell, A., Chow, L., Guth, A. & Dow, S. (2017). PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade. *Veterinary and comparative oncology*.
- Day, D. & Hansen, A.R. (2016). Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Biodrugs*, 30(6), 571-584.
- Dong, H.D., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G.F., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E. & Chen, L.P. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8(8), 793-800.
- Drake, C.G., Jaffee, E. & Pardoll, D.M. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in Immunology, Vol 90: Cancer Immunotherapy*, 90, 51-81.
- Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D. & Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 45(2), 228-247.
- Folk, A. & Bienzle, D. (2010). Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(1-2), 33-38.
- Lipson, E.J., Sharfman, W.H., Drake, C.G., Wollner, I., Taube, J.M., Anders, R.A., Xu, H., Yao, S., Pons, A., Chen, L., Pardoll, D.M., Brahmer, J.R. & Topalian, S.L. (2013). Durable Cancer Regression Off-Treatment and Effective Reinduction Therapy with an Anti-PD-1 Antibody. *Clinical Cancer Research*, 19(2), 462-468.
- Littman, D.R. (2015). Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. *Cell*, 162(6), 1186-1190.
- Läkemedelsindustriföreningen (2017a) (2017-02-10) Keytruda
<http://www.fass.se/LIF/product?12&userType=2&nplId=20150808000062&docType=3> [2017-03-06]
- Läkemedelsindustriföreningen (2017b) (2017-02-02) Opdivo
<http://www.fass.se/LIF/product?15&userType=2&nplId=20141009000029&docType=3> [2017-03-06]
- Madej, T., Lanczycki, C.J., Zhang, D.C., Thiessen, P.A., Geer, R.C., Marchler-Bauer, A. & Bryant, S.H. (2014). MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D297-D303.

- Maekawa, N., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Adachi, M., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S. & Ohashi, K. (2014). Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN-gamma production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS One*, 9(6), e98415.
- Maekawa, N., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Kato, Y., Murata, S. & Ohashi, K. (2016). Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. *Plos One*, 11(6), 13.
- Meng, X., Huang, Z., Teng, F., Xing, L. & Yu, J. (2015). Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 41(10), 868-876.
- O'Donnell, J.S., Long, G.V., Scolyer, R.A., Teng, M.W.L. & Smyth, M.J. (2017). Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treatment Reviews*, 52, 71-81.
- Patnaik, A., Kang, S.P., Rasco, D., Papadopoulos, K.P., Elassaiss-Schaap, J., Beeram, M., Drengler, R., Chen, C., Smith, L., Espino, G., Gergich, K., Delgado, L., Daud, A., Lindia, J.A., Li, X.N., Pierce, R.H., Yearley, J.H., Wu, D., Laterza, O., Lehnert, M., Iannone, R. & Tolcher, A.W. (2015). Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4286-4293.
- Postow, M.A., Callahan, M.K. & Wolchok, J.D. (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 33(17), 1974-U161.
- Regan, D., Guth, A., Coy, J. & Dow, S. (2016). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *Veterinary Journal*, 207, 20-28.
- Ribas, A. (2015). Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discovery*, 5(9), 915-919.
- Shosu, K., Sakurai, M., Inoue, K., Nakagawa, T., Sakai, H., Morimoto, M., Okuda, M., Noguchi, S. & Mizuno, T. (2016). Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Canine Cancer. *In Vivo*, 30(3), 195-204.
- Stephen, T.L., Payne, K.K., Chaurio, R.A., Allegranza, M.J., Zhu, H.R., Perez-Sanz, J., Perales-Puchalt, A., Nguyen, J.M., Vara-Ailor, A.E., Eruslanov, E.B., Borowsky, M.E., Zhang, R.G., Laufer, T.M. & Conejo-Garcia, J.R. (2017). SATB1 Expression Governs Epigenetic Repression of PD-1 in Tumor-Reactive T Cells. *Immunity*, 46(1), 51-64.
- Sznol, M. & Chen, L. (2013). Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(5), 1021-1034.
- Topalian, S.L., Drake, C.G. & Pardoll, D.M. (2012a). Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 24(2), 207-212.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M. & Sznol, M. (2012b). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443-2454.
- Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J.M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A.N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A.J., Grogan, T.R., Mateus, C., Tomasic, G., Glaspy, J.A., Emerson, R.O., Robins, H.,

Pierce, R.H., Elashoff, D.A., Robert, C. & Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528), 568-+.