



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

PATRÍCIA GOMES SANTOS

**Adenocarcinoma do Pâncreas – Estratégias Terapêuticas Atuais e
Perspetivas Futuras**

ARTIGO DE REVISÃO NARRATIVA

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO
PROFESSOR DOUTOR RUI VASCO QUINTAIS GRADIZ

Abril, 2021



Adenocarcinoma do pâncreas – Estratégias Terapêuticas Atuais e Perspetivas Futuras

Patrícia Gomes Santos ¹

Anabela Mota Pinto ^{1,2}

Rui Vasco Quintais Gradiz ^{1,2}

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

² Instituto de Patologia Geral, Coimbra, Portugal

Endereço eletrónico: rgradiz@fmed.uc.pt

Coimbra, Abril 2021

Índice

Resumo	5
Abstract	6
Lista de acrónimos	7
Introdução	11
Metodologia	15
Discussão	15
1. Microambiente tumoral (TME)	15
1.1 Estroma desmoplásico	17
1.1.1. Matriz extracelular (ECM)	17
Hialuronidases.....	17
Inibidores da via de sinalização Hedgehog (Hh)	19
1.1.2. Vascularização	20
Agentes antiangiogénicos	20
1.1.3. Fibroblastos associados a cancro (CAFs)	22
Inibidores da proteína ativadora de fibroblastos (FAP)	23
Inibidores do fator de crescimento transformador-beta (TGF- β)	24
Ácido all-trans retinóico (ATRA)	25
Vitamina D	25
1.2. Microambiente imunossupressor	25
1.2.1. Macrófagos associados ao tumor (TAMs)	26
Agonistas CD40.....	27
Inibidores do recetor do fator estimulante de colónias-1 (CSF-1R)	27
Inibidores do recetor de quimiocinas CC 2 (CCR2)	28
1.2.2. Células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs)	29

BL-8040	30
Entinostat.....	30
1.2.3. Células T reguladoras (Tregs)	31
Mogamulizumab	31
2. Inibidores de <i>checkpoints</i> imunes (ICI)	32
2.1. Proteína citotóxica 4 associada a linfócitos T (CTLA-4)	32
Ipilimumab	33
Tremelimumab.....	34
2.2. Proteína da morte celular programada-1 (PD-1)	34
Pembrolizumab.....	35
Nivolumab.....	36
3. Transferência adotiva de células T (ACT).....	36
Mesotelina	37
Mucina 1 (MUC1)	38
4. Vacinação	39
4.1. Vacinas de células tumorais totais	39
Vacinas modificadas para exprimirem GM-CSF (GVAX)	40
Conclusão.....	42
Agradecimentos	44
Referências bibliográficas	45

Resumo

Este artigo de revisão narrativa teve como principais objetivos resumir os obstáculos ao sucesso terapêutico no adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC) e as terapêuticas atualmente aprovadas para o tratamento do PDAC. Para além disso, são referidos os resultados de ensaios pré-clínicos e clínicos de novas perspectivas terapêuticas, como a imunoterapia dirigida a componentes específicos do microambiente tumoral, a inibição de *checkpoints* imunes, a transferência adotiva de células T e as vacinas antitumorais.

Para este fim, foram usadas as bases de dados MEDLINE-Pubmed, Cochrane Library e *Clinicaltrials.gov*, tendo-se analisado artigos científicos publicados entre 2005 e 2020, relativos ao microambiente tumoral do PDAC, aos regimes terapêuticos atuais e à imunoterapia aplicada ao PDAC.

O PDAC é um cancro altamente letal, com elevada resistência à terapêutica e que, geralmente, se apresenta ao diagnóstico em estágio não ressecável. Verificou-se que o PDAC possui um microambiente tumoral (TME) único, em que as células tumorais se encontram envolvidas por uma abundante reação desmoplásica formada por matriz extracelular e elementos celulares como células imunes, fibroblastos, células endoteliais e fatores de crescimento. O microambiente tumoral, ao interagir entre si, e com células tumorais, promove ativamente a carcinogénese, a progressão tumoral, a metastização e a resistência à terapêutica. Com a descoberta da importância do TME no crescimento do PDAC, os seus componentes tornaram-se alvos terapêuticos promissores, com bons resultados em ensaios pré-clínicos. Todavia, apesar de alguns terem demonstrado benefício, os ensaios clínicos frequentemente falharam em traduzir os resultados pré-clínicos. Verificou-se ainda que a combinação de imunoterapia dirigida a mais do que um alvo específico, ou a combinação de imunoterapia com outras modalidades terapêuticas, pode ter efeito sinérgico com aumento da taxa de resposta. Atualmente, diversos ensaios clínicos procuram determinar a eficácia de estratégias de imunoterapia no PDAC, entre elas, a inibição de *checkpoints* imunes, transferência adotiva de células T e vacinas antitumorais. A combinação de imunoterapia com estratégias inibidoras da ação dos constituintes do microambiente tumoral parece promissora e foi explorada ao longo deste artigo de revisão narrativa.

Palavras-chave: cancro do pâncreas; terapêutica; imunoterapia; terapêutica farmacológica; microambiente tumoral.

Abstract

This narrative review article aimed to summarize the obstacles to the therapeutic success in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and the currently approved therapies for PDAC treatment. In addition, this article refers to preclinical and clinical trials, and their respective results, prepared based on new therapeutic perspectives, such as immunotherapy directed at specific components of the tumor microenvironment, inhibition of immune checkpoints, adoptive cell transfer and anti-tumor vaccines.

We used the databases MEDLINE-Pubmed, Cochrane Library and Clinicaltrials.gov and we analyzed scientific articles published between 2005 and 2020, relating to the tumor microenvironment, current therapeutic regimens and immunotherapy applied to PDAC.

PDAC is a highly lethal cancer, with high resistance to therapy and that, generally, at diagnosis, presents itself in a non-resectable stage. It was found that PDAC has a unique tumor microenvironment, in which the tumor cells are surrounded by an abundant desmoplastic reaction composed of extracellular matrix and cellular elements such as immune cells, fibroblasts, endothelial cells and growth factors. The interactions that occur in the tumor environment itself and between the tumor environment and tumor cells actively promote carcinogenesis, tumor progression, metastasis and resistance to therapy. With the discovery of its role in PDAC growth, its components have become promising therapeutic targets, with good results in preclinical trials. However, although some have shown benefit, clinical trials have often failed to translate preclinical results. It was also found that the combination of immunotherapy directed at more than one specific target, or the combination of immunotherapy with other therapeutic modalities, can have a synergistic effect with an increase in the response rate. Currently, several clinical trials seek to determine the effectiveness of immunotherapy strategies in PDAC, including the inhibition of immune checkpoints, adoptive cell transfer and anti-tumor vaccines. The combination of immunotherapy with strategies that inhibit the action of the components of the tumor microenvironment seems promising and will be explored throughout this review article.

Keywords: pancreatic cancer; therapy, immunotherapy; drug therapy; tumor microenvironment.

Lista de acrónimos

α -SMA – Alfa-actina do músculo liso (do inglês *α -Smooth Muscle Actin*)

ACT – Transferência adotiva de células T (do inglês *Adoptive Cell Transfer*)

APCs – Células apresentadoras de antígenos (do inglês *Antigen Presenting Cells*)

Arg-1 – Arginase-1

ATRA – Ácido all-trans retinóico (do inglês *All-Trans Retinoic Acid*)

CAFs – Fibroblastos associados a cancro (do inglês *Cancer Associated Fibroblasts*)

CAR-T – Células T com recetor quimérico de antígenos (do inglês *Chimeric Antigen Receptor T cells*)

CCL17 - Ligando de quimiocinas CC 17 (do inglês *CC chemokine Ligand 17*)

CCL2 - Ligando de quimiocinas CC 2 (do inglês *CC chemokine Ligand 2*)

CCL22 – Ligando de quimiocinas CC 22 (do inglês *CC chemokine Ligand 22*)

CCR2 – Recetor de quimiocinas CC 2 (do inglês *CC chemokine Receptor 2*)

CCR4 – Recetor de quimiocinas CC 4 (do inglês *CC chemokine Receptor 4*)

CSF-1 – Fator estimulante de colónias-1 (do inglês *Colony Stimulating Factor-1*)

CSF-1R – Recetor do fator estimulante de colónias-1 (do inglês *Colony Stimulating Factor-1 Receptor*)

CTLA-4 – Proteína citotóxica 4 associada a linfócitos T (do inglês *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4*)

CXCL12 – Ligando de quimiocinas CXC 12 (do inglês *CXC chemokine Ligand 12*)

CXCR2 – Recetor de quimiocinas CXC 2 (do inglês *CXC chemokine Receptor 2*)

CXCR4 – Recetor de quimiocinas CXC 4 (do inglês *CXC chemokine Receptor 4*)

ECM – Matriz extracelular (do inglês *Extracellular Matrix*)

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*)

FAP – Proteína ativadora de fibroblastos (do inglês *Fibroblast Activation Protein*)

FGF – Fator de crescimento dos fibroblastos (do inglês *Fibroblast Growth Factor*)

Foxp3 - Fator de transcrição *Forkhead box P3*

FSP – Proteína específica de fibroblastos (do inglês *Fibroblast Specific Protein*)

GM-CSF – Fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*)

GVAX - Vacinas modificadas para exprimirem GM-CSF

HA – Ácido hialurónico (do inglês *Hyaluronic Acid*)

HGF – Fator de crescimento dos hepatócitos (do inglês *Hepatocyte Growth Factor*)

Hh – Via de sinalização Hedgehog

HIF-1 – Fator indutível por hipóxia-1 (do inglês *Hypoxia-Inducible Factor-1*)

ICI – Inibidores de *Checkpoints* Imunes

IDO1 - Indolamina 2,3-dioxigenase 1

IL – Interleucina

INF- α - Interferão-alfa

iNOS - Sintetase do óxido nítrico induzível (do inglês *Inducible Nitric Oxide Synthase*)

mAb – Anticorpo monoclonal (do inglês *Monoclonal Antibody*)

MDSCs – Células supressoras derivadas da linhagem mielóide (do inglês *Myeloid Derived Supressor Cells*)

MHC-I/II – Complexo *major* de histocompatibilidade-I/II (do inglês *Major Histocompatibility Complex-I/II*)

MMP – Metaloproteinases da matriz (do inglês *Matrix Metalloproteinases*)

MMR - Sistema de reparação de DNA “*Mismatch Repair*”

MUC1 – Mucina 1

ORR – Taxa de resposta tumoral objetiva (do inglês *Objective Response Rate*)

OS – Sobrevivência global (do inglês *Overall Survival*)

PD-1 – Proteína da morte celular programada-1 (do inglês *Programmed Death protein-1*)

PD-L1/2 – Ligando da proteína da morte celular programada-1/2 (do inglês *Programmed Death Ligand-1/2*)

PDAC – Adenocarcinoma ductal do pâncreas (do inglês *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*)

PFS – Progressão livre de doença (do inglês *Progression Free Survival*)

PSCs – Células pancreáticas estreladas (do inglês *Pancreatic Stellate Cells*)

PTCH – Recetor transmembranar *Patched*

SDF1A - Fator-1-alfa derivado de células do estroma (do inglês *Stromal cell Derived Factor-1 α*)

SHh – Sonic Hedgehog

SMO – Proteína *Smoothened*

TAMs – Macrófagos associados ao tumor (do inglês *Tumor Associated Macrophages*)

TANs – Neutrófilos associados ao tumor (do inglês *Tumor Associated Neutrophils*)

TGF- β – Fator de crescimento transformador-beta (do inglês *Transforming Growth Factor- β*)

TME – Microambiente tumoral (do inglês *Tumor Microenvironment*)

tMUC1 – Mucina 1 associada ao tumor

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor- α*)

VDR – Recetor da vitamina D (do inglês *Vitamin D Receptor*)

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGFR – Recetor do fator de crescimento vascular endotelial (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)

Introdução

O cancro do pâncreas representa a 7^a causa de morte mais comum por cancro e o 11^o cancro com maior incidência, a nível global. Em 2018, teve uma prevalência estimada de 2.5% e representou 4.5% das mortes relacionadas com cancro. ^{1,2} Com um *ratio* mortalidade/incidência de 94%, atualmente o cancro do pâncreas é um dos cancros mais fatais e com pior prognóstico associado, com uma taxa de sobrevivência a 5 anos de 9%. ² A incidência e a mortalidade são superiores em países desenvolvidos ² e aumentam com a idade com, aproximadamente, 90% das mortes a ocorrerem após os 55 anos. ³ Ao contrário do que se verificou noutros cancros, na última década, por motivos desconhecidos, as taxas de incidência e de mortalidade do cancro do pâncreas têm vindo a aumentar. ^{4,5} Prevê-se que, em breve, na União Europeia, como aconteceu nos Estados Unidos da América (EUA) em 2016, o cancro do pâncreas ultrapasse o cancro da mama, tornando-se na 3^a causa mais frequente de mortes por cancro. ¹ Nos EUA projeta-se que, em 2030, o cancro do pâncreas se converta na 2^a principal causa de morte por cancro, ultrapassado apenas pelo cancro do pulmão. ^{4,5}

O adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC) é o subtipo mais frequente de cancro do pâncreas, correspondendo a cerca de 90% dos tumores exócrinos deste órgão. ⁶ Apesar de ser uma doença complexa e multifatorial, tem diversos fatores de risco associados, como o tabaco, consumo etílico marcado, obesidade, pancreatite crónica, diabetes mellitus, sexo masculino e história familiar. ⁷ O PDAC, na maioria dos casos, surge na sequência de uma lesão precursora conhecida como neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) que, com a acumulação contínua de alterações genéticas, se torna progressivamente mais displásica. ⁸ Apesar de ser uma doença heterogénea, verificam-se alterações recorrentes em quatro genes promotores da carcinogénese e da progressão tumoral: *Kirsten Rat Sarcoma (KRAS, 90-95%)*, *Tumor protein P53 (TP53, 75-90%)*, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A, 50-98%)* e *Smad family member 4 (SMAD4, 20-50%)*. ⁶⁻⁸ A mutação do oncogene *KRAS* é a mais comum no PDAC, e está presente desde o início da carcinogénese, em lesões de baixo grau. À medida que as lesões precursoras aumentam de grau, também a frequência da mutação do *KRAS* se acentua. ^{6,7}

O estadiamento (**Tabela 1**) do tumor no momento do diagnóstico é o fator mais importante de prognóstico. ¹ Em fases iniciais da carcinogénese, há ausência de sinais e sintomas, no entanto, com a progressão da doença, podem surgir sinais e sintomas insidiosos e inespecíficos como perda de peso, anorexia, icterícia, acolia fecal, colúria, e entre outros. ⁹ Devido à ausência de manifestações clínicas específicas em fases precoces da doença e à

falta de métodos de diagnóstico com sensibilidade para a sua deteção em estádios iniciais, a maioria dos PDAC são diagnosticados em estádios avançados. ² Aquando do diagnóstico, apenas 15% dos doentes apresentam doença ressecável (estádio I/II), 35% apresentam doença localmente avançada (estádio III) e 50% apresentam doença metastizada (estádio IV). ¹⁰

Tabela 1. Sistema de estadiamento TNM do cancro do pâncreas segundo a AJCC (8ª edição)

Tumor primário (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor confinado ao pâncreas, com diâmetro \leq 2 cm
T2	Tumor confinado ao pâncreas, com diâmetro $>$ 2cm e \leq 4 cm
T3	Tumor confinado ao pâncreas, com diâmetro $>$ 4 cm
T4	Tumor estende-se além do pâncreas e envolve o plexo celíaco ou a artéria mesentérica superior
Gânglios linfáticos regionais (N)	
Nx	Gânglios linfáticos não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases em 1 a 3 gânglios linfáticos regionais
N2	Metástases em \geq 4 gânglios linfáticos regionais
Metástases à distância (M)	
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância presentes
Estádio	
0	Tis N0 M0
IA	T1 N0 M0
IB	T2 N0 M0, T1 N1 M0
IIA	T3 N0 M0, T2 N1 M0, T1 N2 M0
IIB	T3 N1 M0, T2 N2 M0
IIIA	T3 N2 M0
IIIB	T4 qualquer N M0
IV	Qualquer T qualquer N M1

As opções de tratamento são bastante limitadas. A ressecção cirúrgica do tumor primário com linfadenectomia dos gânglios linfáticos regionais e quimioterapia adjuvante ¹¹ é o único tratamento com potencial curativo. ¹² Nos pacientes submetidos a ressecção cirúrgica, as taxas de recorrência local e sistêmica da doença são elevadas e a taxa de sobrevivência aos 5 anos ronda os 20%. ^{6,11,13} Os pacientes que, ao diagnóstico, apresentam doença em estágio III ou IV não são elegíveis para tratamento curativo. Desta forma, a quimioterapia é o tratamento utilizado nestes doentes, para prolongar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida.

Em 1997, a gemcitabina tornou-se o tratamento de 1ª linha para o PDAC metastático, providenciando uma sobrevivência global (OS) média de 6 meses e melhoria da qualidade de vida, ¹⁴ sendo que, a OS corresponde ao tempo entre a inclusão no estudo e a morte, independentemente da causa. ¹⁵ Devido à reduzida sobrevida atingida com a administração única de gemcitabina, a eficácia da sua associação a outros regimes terapêuticos foi amplamente testada em ensaios clínicos. ¹⁴ Apesar da combinação de gemcitabina com erlotinib, um inibidor do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), ter demonstrado aumento da OS comparativamente à administração de gemcitabina (6.24 vs 5.91 meses), ¹⁶ nenhuma associação revelou superioridade significativa relativamente ao regime já estabelecido. ¹⁴

Em 2011, a combinação de ácido fólico, fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina (*FOLFIRINOX*), demonstrou vantagem sobre gemcitabina no tratamento do PDAC, com uma OS média de 11.1 meses (vs 6.8 meses, no grupo controlo). No entanto, *FOLFIRINOX* apresentou efeitos adversos significativos como neutropenia febril, trombocitopenia, diarreia e neuropatia periférica. ¹⁷ Na fase III de um ensaio clínico, realizada para confirmar o benefício terapêutico e a segurança de um fármaco numa amostra alargada e em comparação com o tratamento padronizado ou placebo, ¹⁵ foi testada uma formulação de paclitaxel ligado a albumina (*nab-paclitaxel*), em associação a gemcitabina. ¹⁸ Neste ensaio participaram 861 pacientes com PDAC em estágio IV. A OS foi superior no grupo experimental (8.5 vs 6.7 meses), no entanto, nos pacientes que receberam a associação verificou-se maior frequência de efeitos adversos, como neuropatia periférica. ¹⁸ Posto isto, *FOLFIRINOX* e *gemcitabina/nab-paclitaxel* estão ambos aprovados para o tratamento de 1ª linha do PDAC metastizado, em pacientes no grau 0 ou 1 (**Tabela 2**) da escala ECOG *performance status*. ^{5,14}

Tabela 2. Escala *Eastern Collaborative Oncology Group (ECOG) performance status* (Adaptado de Sok et al., 2019) ¹⁹

Grau	Descrição
0	Totalmente ativo. Capaz de realizar todas as suas atividades sem restrição como previamente ao surgimento da doença.
1	Restrição à atividade física extenuante, mas capaz de realizar trabalhos de natureza leve ou sedentária.
2	Capaz de realizar as suas atividades de vida diária, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho. Levantado mais de 50% das horas de vigília.
3	Capaz de realizar somente autocuidados limitados. Confinado ao leito ou cadeira em mais de 50% das horas de vigília.
4	Incapaz de realizar quaisquer autocuidados. Totalmente confinado ao leito ou cadeira.
5	Morte

Apesar dos esforços, o PDAC permanece um cancro altamente letal, com reduzida sobrevida e marcada quimiorresistência, tornando-se clara a necessidade de serem desenvolvidas novas estratégias terapêuticas.

Nos últimos anos, a imunoterapia tem vindo a ser incorporada no tratamento de algumas neoplasias malignas e os resultados são promissores, reforçando esta opção como um 4º pilar no tratamento oncológico, conjuntamente com cirurgia, quimioterapia e radioterapia. ²⁰ No entanto, este sucesso não se refletiu no tratamento do PDAC, que não responde à imunoterapia convencional. Esta ausência de resposta pode ser explicada pelo facto de o PDAC reunir um conjunto de características que o tornam particularmente difícil de tratar, entre elas o seu microambiente tumoral (TME) que, por diversos mecanismos, tem a capacidade de promover uma resistência à terapêutica e à progressão tumoral, contribuindo em grande parte para o mau prognóstico associado a esta doença. Neste trabalho vão ser descritos os componentes deste complexo TME e os mecanismos através dos quais estes limitam o sucesso da imunoterapia. Serão também expostas estratégias que utilizam os componentes do TME como alvo terapêutico, para bloquear a sua ação na carcinogénese e permitir assim a expressão do potencial da imunoterapia. Por último, irão ser referidos os sucessos, insucessos e os progressos da aplicação de novas estratégias de imunoterapia no PDAC, nomeadamente, a inibição de *checkpoints* imunes, a transferência adotiva de células T e a vacinação.

Metodologia

Este artigo de revisão bibliográfica foi realizado através da pesquisa e análise de artigos científicos publicados e referenciados nas bases de dados MEDLINE – Pubmed e Cochrane Library, publicados *online* entre novembro de 2005 e junho de 2020. A pesquisa foi limitada a artigos escritos em inglês e português. De 283 artigos, 109 foram selecionados de acordo com o título e o conteúdo do resumo. As palavras chave utilizadas na pesquisa foram os termos MeSH “pancreatic cancer”, “therapy”, “immunotherapy”, “drug therapy” e “tumor microenvironment”. Adicionalmente, para cada alvo terapêutico individual explorado neste artigo de revisão foram utilizados o respetivo alvo ou a terapêutica como palavra chave (por exemplo, “PEGPH20”, “Sonic Hedgehog inhibitors”). A base de dados *Clinicaltrials.gov* foi utilizada para obtenção de informação acerca dos ensaios clínicos mencionados nos artigos recolhidos na pesquisa bibliográfica.

Discussão

1. Microambiente tumoral (TME)

A imunovigilância tumoral é uma teoria que prevê que o sistema imunitário é capaz de suprimir tumores em fases iniciais da doença através da identificação de neoantígenos e da eliminação de células tumorais, por células T efetoras.²¹ Tumores pouco imunogénicos ou que possuem mecanismos supressores da função imune, escapam à imunovigilância e progridem, tornando-se clinicamente evidentes. Surgiu então o conceito de imunoeedição tumoral, baseado na capacidade de o sistema imunitário limitar o desenvolvimento do tumor mas também de promover o seu crescimento.^{21,22} A imunoterapia, pelo bloqueio de sinais imunossupressores promotores do crescimento tumoral, estimula a eliminação do tumor pelo sistema imune. Os avanços na área da imunoterapia revolucionaram o tratamento de diversas neoplasias sólidas e hematológicas. No entanto, o PDAC permanece refratário à imunoterapia convencional pois, para além das características já mencionadas, é um tumor imunologicamente “frio”, porque possui poucos neoantígenos tumorais que possam ser reconhecidos pelo sistema imunitário.²² No entanto, o obstáculo mais significativo contra a eficácia da imunoterapia no PDAC é o seu microambiente tumoral (TME). **(Figura 1)**

O TME refere-se especificamente ao ambiente interno onde os tumores ocorrem e se desenvolvem.²³ No PDAC, o TME é formado por células tumorais envolvidas por um estroma fibroso denso, que pode representar até 90% do volume tumoral.⁸ O estroma é constituído por células imunes infiltrativas, células endoteliais, fibroblastos, neurónios, pericitos, fatores

solúveis (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores pró-angiogénicos) e proteínas da matriz extracelular (ECM), entre elas, colagénio, ácido hialurónico (HA) e fibronectina.^{24–26}

O TME contribui para a progressão tumoral de forma multifacetada. Através do estroma fibroso, constitui uma barreira física à penetração de agentes terapêuticos na massa tumoral, contribuindo assim para a quimiorresistência; é também capaz de induzir um microambiente imunossupressor promotor da evasão às defesas do hospedeiro, por inibição direta da imunidade antitumoral ou por indução da proliferação de células imunossupressoras.²⁷ As características do TME facilitam a proliferação, crescimento, invasão, metastização e resistência à terapêutica no PDAC.^{24,27} Devido à sua influência na carcinogénese, o entendimento dos mecanismos de atuação do TME e o seu estudo como potencial alvo terapêutico, tornaram-se muito relevantes. Os ensaios clínicos estão focados nos seus dois grandes compartimentos: o estroma desmoplásico e o microambiente imunossupressor.

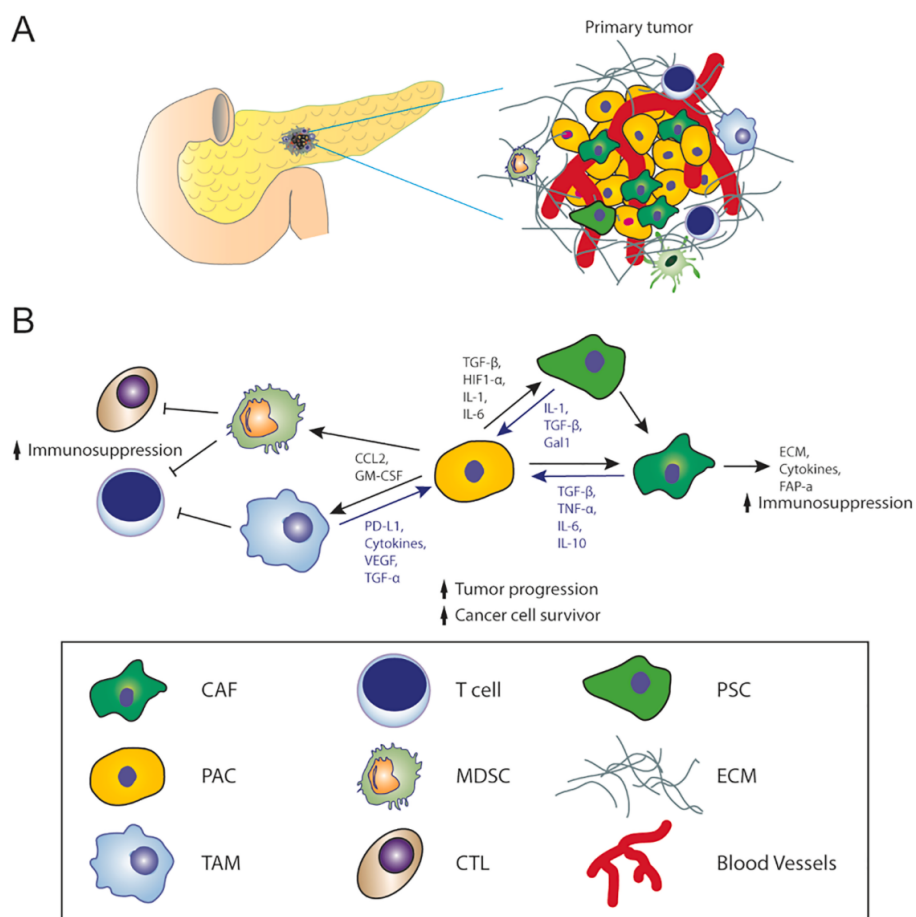


Figura 1. Microambiente tumoral (TME) do cancro do pâncreas. (A) O TME cria uma barreira à penetração de fármacos citotóxicos e de imunoterapia. **(B)** As complexas interações entre os elementos

do TME induzem mecanismos de resistência que promovem a progressão tumoral, imunossupressão e sobrevivência das células tumorais. **CAF:** fibroblastos associados a cancro. **CTL:** linfócitos T citotóxicos. **ECM:** matriz extracelular. **MDSC:** células supressoras derivadas da linhagem mielóide. **PAC:** adenocarcinoma pancreático. **PSC:** células pancreáticas estreladas. **TAM:** macrófagos associados ao tumor. (Adaptado de *Schizas et al.*, 2020)²⁸

1.1 Estroma desmoplásico

Uma das características histopatológicas do PDAC é a desmoplasia, que corresponde à existência de fibrose extensa no tumor primário e em localizações secundárias.^{29,30} A desmoplasia manifesta-se através da secreção excessiva de proteínas da ECM e da conversão de fibroblastos residentes no pâncreas na sua variante fenotípica de miofibroblastos.²⁷ A desmoplasia forma uma barreira mecânica à volta das células tumorais, limitando a penetração de fármacos, de células imunes infiltrativas e a perfusão tumoral.²⁹

O PDAC desenvolve-se num ambiente hipóxico, promotor da progressão tumoral. Células tumorais secretam agentes pró-angiogénicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), no entanto, formam-se neovasos aberrantes e ineficazes na perfusão tumoral.³¹ As células tumorais, em contraste, produzem também fatores antiangiogénicos, como a angiostatina, intensificando a hipóxia.^{27,32} A hipóxia gerada ativa células pancreáticas estreladas (PSCs), promotoras da produção de proteínas da ECM, perpetuando a fibrose e, conseqüentemente, o ambiente hipóxico.³² Em resposta à hipóxia, ocorre ativação do fator indutível por hipóxia-1 (HIF-1), que, por mecanismos adaptativos, contribui para a manutenção da viabilidade celular em condições de hipóxia, inibição da apoptose, proliferação celular, invasão, metastização e quimiorresistência.^{23,27,32}

A maioria dos ensaios clínicos cujo alvo é o estroma focam-se em três constituintes fundamentais: ECM, vascularização e fibroblastos.

1.1.1. Matriz extracelular (ECM)

Hialuronidases

O ácido hialurónico (HA) é um glicosaminoglicano hidrofílico abundante na ECM do PDAC. Ensaio pré-clínicos demonstraram que o HA promove a carcinogénese ao atuar como molécula sinalizadora que ativa vias de sinalização intracelulares, promovendo a invasão e a

metastização.^{33,34} A acumulação de HA aumenta a pressão intersticial, com colapso de vasos sanguíneos e redução da perfusão tumoral.^{8,35}

A elevada concentração de HA na ECM está associada a pior prognóstico.²⁹ Numa análise retrospectiva, que incluiu 110 pacientes, verificou-se que a OS em pacientes com elevada acumulação de HA foi inferior à de pacientes com menor acumulação (9.3 vs 24.3 meses, respetivamente).^{30,35} Com base na associação entre a acumulação de HA e a dificuldade de acesso de fármacos ao tumor, com consequente diminuição da sobrevida, surgiu interesse no desenvolvimento de estratégias redutoras da concentração de HA no TME.

Hialuronidases são enzimas endógenas que degradam HA. PEGPH20 é a forma peguilada da hialuronidase recombinante humana PH20, com um tempo de semivida de 1 a 2 dias, o que permite atingir a circulação sistémica e o alvo terapêutico.^{33,35} A administração sistémica de PEGPH20 em modelos pré-clínicos revelou depleção da concentração de HA no estroma em 24 horas, diminuição da pressão intersticial intratumoral e aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos.²⁵ Devido a estes resultados promissores, foram realizados ensaios clínicos para testar se o uso concomitante de PEGPH20 e de agentes sistémicos poderia traduzir-se no aumento da eficácia destes últimos.

A fase Ib/II de um ensaio clínico corresponde à realização de um ensaio clínico de fase Ib, na qual o fármaco é avaliado pela primeira vez, em doses ascendentes, numa amostra reduzida de pacientes, para determinar a segurança e a dose mínima eficaz; seguida de um ensaio clínico de fase II, onde é explorada a eficácia terapêutica num grupo de doentes restrito.¹⁵ Um ensaio clínico de fase Ib/II, foi realizado em 28 pacientes com PDAC em estágio IV, para avaliar a combinação de doses gradualmente superiores de PEGPH20 com gemcitabina.³⁶ Ocorreu aumento significativo da perfusão tumoral, da OS e da sobrevivência livre de progressão (PFS), que corresponde ao intervalo entre o início da terapêutica e o agravamento da doença ou morte por qualquer causa,¹⁵ sendo que, em pacientes com elevadas concentrações de HA, verificaram-se tempos mais longos de OS e PFS.^{35,36} No seguimento deste ensaio foi realizado um ensaio clínico de fase II, em 279 pacientes com PDAC em estágio IV sem tratamento prévio, para comparar o efeito da associação *nab-paclitaxel/gemcitabina* ± PEGPH20.³⁷ Por elevada incidência de eventos tromboembólicos foi implementada profilaxia com enoxaparina. A PFS no grupo experimental foi superior à do grupo controlo (6.0 vs 5.3 meses, respetivamente), principalmente nos pacientes com maior concentração de HA intratumoral (9.2 vs 5.2 meses).³⁷

Em 2019, um ensaio de fase Ib/II testou a atividade de *FOLFIRINOX* ± PEGPH20 em 138 pacientes com doença pancreática em estágio IV. No grupo experimental foram reportados mais efeitos adversos, gastrointestinais e tromboembólicos. A OS no grupo experimental (7.7 meses) foi inferior à do grupo controle (14.4 meses). O estudo terminou precocemente devido a sobrevivência inferior no grupo experimental.^{33,35} Os autores assumem que a toxicidade neste grupo possa advir de interações adversas entre as terapêuticas ou de efeitos negativos exercidos por esta associação, no TME. A toxicidade elevada, no grupo experimental, provocou atrasos na administração dos fármacos e redução das doses fornecidas, pelo que, a mortalidade poderá dever-se a menor exposição à terapêutica.³³ Os autores enaltecem a importância da realização de ensaios pré-clínicos na avaliação de associações terapêuticas e suas interações.

A fase III de um ensaio clínico foi efetuada para avaliar a eficácia da associação de *gemcitabina/nab-paclitaxel* ± PEGPH20, em 494 pacientes com adenocarcinoma pancreático em estágio IV não tratado e com elevada concentração de HA intratumoral.³⁸ A associação não prolongou a OS no grupo experimental, comparativamente ao grupo controle (11.2 vs 11.5 meses); nem a PFS (7.1 meses nos dois grupos). Os autores concluem que não há suporte para o desenvolvimento de estudos adicionais acerca da aplicação de PEGPH20 no tratamento do PDAC metastático.³⁸

Inibidores da via de sinalização Hedgehog (Hh)

A via de sinalização Hedgehog (Hh) está implicada na carcinogénese de vários tumores, incluindo tumores pancreáticos. Quando o ligando, Sonic Hedgehog (SHh), estabelece ligação com o recetor transmembranar Patched (PTCH), o efeito inibitório que este exerce sobre a proteína Smoothened (SMO) é anulado e a SMO é ativada.³⁹ A ativação da SMO induz a ativação e translocação para o núcleo dos fatores de transcrição GLI-1, promovendo a expressão de vários genes alvo envolvidos na proliferação, sobrevivência e angiogénese de diversas neoplasias.^{39,40}

O ligando SHh, sobreexpresso em aproximadamente 70% dos tumores pancreáticos,^{41,42} induz a expressão aberrante de Hh, estimulando a secreção de metaloproteínases da matriz (MMP), de fatores de crescimento nervoso e a diferenciação de PSCs em miofibroblastos.⁸ É também aumentada a motilidade e a capacidade de invasão das células tumorais pancreáticas.⁴⁰

Em modelos experimentais, a inibição da via Hh revelou redução do estroma e maior penetração de agentes sistêmicos, providenciando evidência para a realização de ensaios clínicos.^{39,40}

O vismodegib é um antagonista de SHh, testado em múltiplos ensaios clínicos. Num ensaio clínico de fase Ib/II, NCT01064622, realizado em 106 pacientes com cancro pancreático em estágio IV, foi associado a gemcitabina. A adição de vismodegib a gemcitabina não prolongou a OS nem a PFS, relativamente à administração de gemcitabina.⁴¹ A associação de vismodegib a *gemcitabina/nab-paclitaxel* foi testada num ensaio clínico de fase II, NCT01088815. A adição de vismodegib não prolongou significativamente a OS, comparativamente à OS atingida com *gemcitabina/nab-paclitaxel* (10 vs 8.7 meses, respetivamente).⁴⁰ Estes resultados não suportavam a continuidade da investigação da ação dos inibidores SHh nesta população de pacientes.⁴⁰

Olive et al., demonstraram que a administração de saridegib (IPI-926), inibidor da SMO, aumenta a penetração de gemcitabina no TME, em modelos animais de PDAC.³⁹ Saridegib foi testado em diversos ensaios clínicos, com resultados promissores. No entanto, um ensaio clínico de fase II, que testou a associação de saridegib e gemcitabina, terminou precocemente após a deteção de OS e PFS inferiores no grupo experimental.⁴²

Várias hipóteses procuram explicar o insucesso desta terapêutica, como a existência de limitações nos modelos animais utilizados em ensaios pré-clínicos ou de efeitos *off-target* dos fármacos.⁴³ Alguns ensaios pré-clínicos sugerem ainda que a inibição desta via, apesar de reduzir a desmoplasia, incrementa a progressão tumoral, daí a falha no prolongamento da OS.⁴⁴

1.1.2. Vascularização

Agentes antiangiogénicos

O crescimento de neoplasias malignas sólidas depende de fenómenos de angiogénese. Os agentes antiangiogénicos possuem benefício terapêutico, estando aprovados para o tratamento de diversos cancros como glioblastoma, cancro coloretal e cancro do pulmão de não pequenas células.²⁵ No entanto, ainda nenhum agente antiangiogénico demonstrou benefício clínico no tratamento do PDAC.

Através de modelos animais e de linhas celulares de pacientes, verificou-se que o PDAC é um tumor pouco vascularizado, com vasos de diâmetro inferior ao dos vasos presentes no pâncreas normal.^{25,31} Não obstante ser hipovascular, a angiogénese é crucial para que ocorra invasão e metastização no PDAC. HIF-1, que surge devido à hipoxia, para além dos efeitos já mencionados, aumenta a expressão de VEGF-A, o subtipo da família VEGF mais estudado, promovendo a angiogénese e, conseqüentemente, a invasão e a metastização.³¹ Desta forma, estima-se que exista potencial terapêutico na administração de agentes antiangiogénicos.

VEGF, o estimulador mais potente da proliferação de células endoteliais, é expresso em 93% dos PDAC. Diversos estudos comprovam que a sobreexpressão de VEGF-A e do seu recetor (VEGFR) promovem a proliferação, invasão e metastização nesta doença.⁴⁵ Em modelos ortotópicos de PDAC, a administração de terapêutica anti-VEGF demonstrou redução do crescimento do tumor e da densidade microvascular intratumoral.²⁵

Bevacizumab, um anticorpo monoclonal (mAb) anti VEGF-A, revelou OS média de 8.8 meses, em associação a gemcitabina, num ensaio clínico de fase II que incluiu 52 pacientes com PDAC em estágio IV.⁴⁶ No entanto, num ensaio clínico de fase III, em que participaram 602 pacientes com PDAC em estágio III/IV, a adição de bevacizumab a gemcitabina não aumentou a OS, relativamente à administração de gemcitabina (5.8 vs 5.9 meses).⁴⁷ A associação de bevacizumab ao regime erlotinib + gemcitabina, foi testada num ensaio clínico de fase III, e, no grupo experimental, não houve prolongamento da OS, apesar de ter ocorrido um aumento estatisticamente significativo da PFS.⁴²

Foram realizados diversos ensaios clínicos com o objetivo de determinar a eficácia de outros agentes antiangiogénicos como aflibercept (inibidor VEGF), axitinib e sorafenib (pequenas moléculas inibidoras do recetor da tirosina cinase).⁴² Estes regimes foram testados em combinação com gemcitabina em ensaios clínicos de fase III, sem aumento da OS.

Numa meta-análise realizada com fármacos anti-VEGF/VEGFR (axitinib, bevacizumab, aflibercept e elpamotide), concluiu-se que a inibição da angiogénese, apesar de aumentar de forma pouco significativa a PFS e a taxa de resposta tumoral objetiva (ORR), que corresponde à proporção de doentes que demonstraram respostas parciais ou completas,¹⁵ não contribui para o prolongamento da OS.⁴⁸

1.1.3. Fibroblastos associados a cancro (CAFs)

Os fibroblastos associados a cancro (CAFs) compõem a população de células mais abundante no estroma do PDAC ⁴⁹ e desenvolvem-se a partir de células estaminais mesenquimatosas, de fibroblastos quiescentes residentes no pâncreas e de PSCs, que adquirem fenótipo de miofibroblastos e representam a maior fonte de CAFs no PDAC. ^{50,51} A formação de CAFs é estimulada por diversos mediadores, entre eles, ligando de quimiocinas CC 2 (CCL2), fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) e fator de crescimento dos fibroblastos (FGF); e a sua ativação ocorre através da via de sinalização Hh e de citocinas como fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucinas (IL)-1, -6 e -10. ⁵¹ A população de CAFs é heterogénea, pelo que, não foi ainda estabelecido um marcador específico que comprove a sua ativação, no entanto, CAFs ativos podem expressar alfa-actina do músculo liso (α SMA), proteína ativadora de fibroblastos (FAP), fator-1 α derivado de células do estroma (SDF1A) e proteína específica de fibroblastos (FSP). ^{51,52} CAFs ativados abundam no estroma, podem compreender até 85% das células estromais, e encontram-se densamente organizados em torno de estruturais tumorais. ⁵³ Uma vez ativos, contribuem para a progressão tumoral de diversas formas. Geram desmoplasia pela secreção abundante de proteínas da ECM e secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que estimulam o crescimento tumoral. ⁵³

CAFs FAP+ contribuem para o estabelecimento do microambiente imunossupressor pelo aumento da expressão de ligandos de *checkpoints* imunes. ⁵⁴ *Checkpoints* imunes, como a proteína citotóxica 4 associada a linfócitos T (CTLA-4) e proteína da morte celular programada-1 (PD-1), constituem pontos de controlo que, durante uma resposta imune, limitam a ativação de linfócitos T. ⁵⁵ CAFs FAP+ promovem também imunossupressão ao excluírem linfócitos T CD8+ do TME, ⁵⁴ que são células fundamentais na geração de respostas imunes antitumorais e estão proporcionalmente relacionadas com a sobrevida. ²⁷ Macrófagos associados ao tumor (TAMs) são células imunes que compreendem uma porção significativa do componente celular imunossupressor do TME. CAFs FAP+ estimulam a polarização de TAMs para o fenótipo imunossupressor através da produção de IL-6, IL-10 e TGF- β , contribuindo para a imunossupressão. ⁵⁴ A diversidade de ações exercidas por CAFs na modulação do TME torna estas células fundamentais para a iniciação, progressão, invasão, metastização e quimiorresistência do PDAC. ^{51,53} Devido à significância de CAFs na promoção deste cancro, torna-se imperativa a investigação de estratégias terapêuticas que manipulem a ação destas células.

As estratégias terapêuticas surgem a partir de duas abordagens distintas. Por um lado, através de terapêuticas redutoras do estroma, como nab-paclitaxel e PEGPH20. Por outro lado, como vai ser explorado a partir daqui, através de estratégias terapêuticas redutoras da ativação e proliferação dos CAFs.⁵³

O ligando SHh, secretado por células pancreáticas, estimula a ativação de CAFs através da ligação ao seu recetor SMO. A inibição da via Hh foi ativamente investigada e tornou-se na primeira abordagem bem-sucedida na inibição de CAFs, em ensaios pré-clínicos.²⁴ No entanto, como referido, estes resultados não foram reproduzidos nos ensaios clínicos.

Inibidores da proteína ativadora de fibroblastos (FAP)

A inibição da proteína ativadora de fibroblastos (FAP) é uma abordagem investigada para o bloqueio dos CAFs. Feig *et al.*, consideraram a possibilidade de que CAFs FAP+ poderiam mediar a imunossupressão e levaram a cabo um ensaio pré-clínico no qual diminuíram o número de células FAP+, através da expressão seletiva de recetores da toxina diftérica nestas células.⁵⁶ A redução de CAFs FAP+ traduziu-se no abrandamento do ritmo de crescimento tumoral, exceto quando foram removidas células T efectoras. A diminuição do crescimento do tumor tornou-se mais acentuada quando, à depleção de CAFs FAP+, foram associados inibidores de *checkpoints* imunes (ICI).⁵⁶ Segundo os dados, o bloqueio de células FAP+ reduz o crescimento tumoral, mediado pelo sistema imune, e potencia a eficácia da imunoterapia com ICI, sustentando a hipótese de que CAFs FAP+ são imunossupressores.⁵⁶

Foi também demonstrado que o ligando de quimiocinas CXC 12 (CXCL12), produzido por CAFs FAP+, é crítico para a imunossupressão mediada por CAFs. Para confirmar estes achados, procederam à administração de AMD3100, um inibidor do recetor de quimiocinas CXC 4 (CXCR4), que é recetor de CXCL12. Verificou-se aumento da infiltração de células imunes e efeito sinérgico quando associado a ICI, confirmando que o ligando CXCL12 medeia a exclusão de células imunes efectoras do TME.^{22,56} A pequena molécula inibidora, AMD3100 (Plerixafor), está a ser estudada num ensaio clínico de fase II, NCT04177810, em combinação com cemiplimab (anti PD-1). Estes achados são de elevada importância clínica, não só devido à prevalência de CAFs FAP+ no PDAC, mas porque elucidam para a existência de interações entre o estroma e as células imunes e para a importância de uma abordagem terapêutica multimodal que atinja ambos os componentes do TME.²⁹ O antagonismo de CXCR4 continuará a ser desenvolvido mais adiante neste trabalho.

Pequenas moléculas inibidoras da FAP foram investigadas na depleção dos CAFs. Gunderson et al., realizaram um ensaio pré-clínico em que testaram os efeitos da pequena molécula inibidora da FAP, UAMC-1110. UAMC-1110 foi administrada em monoterapia, e em combinação com radiação, e verificou-se diminuição da quantidade de TAMs e incremento da infiltração e da função de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺.⁵⁴ No entanto, manteve-se a progressão tumoral, sem melhoria da sobrevida, pelo que, não ocorreu atividade significativa.⁵⁴

Outra abordagem explorada na redução de CAFs FAP+ foi a transferência adotiva de células T (ACT) modificadas para expressarem um recetor quimérico de antígenos (CAR-T) específico para FAP.⁵⁷ ACT é uma técnica que consiste na colheita e expansão em laboratório de linfócitos T com especificidade para antígenos tumorais, que são posteriormente transferidos para o doente.²⁸ Uma das formas de ACT é a imunoterapia com células CAR-T. Em modelos animais de PDAC, células CAR-T-FAP provocaram diminuição da produção de proteínas da ECM e do crescimento tumoral, o que motivou vários grupos a aplicar células CAR-T-FAP no bloqueio dos CAFs.⁵⁸ O efeito destas células em tumores sólidos, incluindo o PDAC, está a ser testado num ensaio clínico de fase I, NCT03932565.⁵⁷ Em contraste, há evidências de que, pela expressão da FAP em adipócitos e em células estaminais mesenquimatosas, a terapêutica com CAR-T-FAP origina toxicidade severa com caquexia e falência da medula óssea.^{54,57} O debate relativamente à segurança desta terapia encontra-se a decorrer.

Inibidores do fator de crescimento transformador-beta (TGF-β)

O fator de crescimento transformador-beta (TGF-β), ativador de CAFs, participa na via de transdução de sinal mais frequentemente mutada no PDAC e é uma abordagem terapêutica atualmente investigada.⁵⁹ Em condições fisiológicas, TGF-β promove a proliferação, diferenciação e manutenção da homeostasia celular, no entanto, na carcinogénese, desempenha uma função mais complexa dependente do estágio desta.⁶⁰ No estágio inicial do desenvolvimento do tumor, TGF-β promove supressão tumoral por inibição da proliferação celular. Em estádios avançados, as células tumorais anulam este efeito imunossupressor e as formas patológicas de TGF-β passam a estimular o crescimento, invasão, evasão imune e metastização do tumor.⁶⁰ O antagonismo de TGF-β em ensaios pré-clínicos demonstrou benefícios na diminuição da densidade do estroma e na supressão de metástases.²⁴

Galunisertib, um inibidor TGF-β, foi testado em combinação com gemcitabina, num ensaio clínico de fase Ib/II, que incluiu 156 pacientes com adenocarcinoma pancreático em estágio

III/IV, para verificar se a sua ação redutora do estroma se poderia traduzir em maior penetração de quimioterapia no TME.⁵⁹ Os resultados revelaram que o perfil de segurança da associação é semelhante ao da gemcitabina e que a OS foi superior no grupo experimental relativamente ao grupo placebo (8.9 vs 7.1 meses, respetivamente).⁵⁹ Com base nestas observações promissoras, há interesse na realização de ensaios clínicos que validem o efeito terapêutico de galignisertib, com quimioterapia e imunoterapia.

Ácido all-trans retinóico (ATRA)

As PSCs, no pâncreas saudável, armazenam ácido retinóico, um metabolito da vitamina A. No PDAC, quando ativadas, perdem as reservas de ácido retinóico e adquirem fenótipo de miofibroblastos, contribuindo para a ativação dos CAFs. O ácido all-trans retinóico (ATRA), um derivado da vitamina A, está aprovado no tratamento da leucemia promielocítica aguda.²⁵ A restituição das reservas de vitamina A em modelos animais de PDAC, por administração de ATRA, reduziu a desmoplasia e o crescimento tumoral, motivando a realização de um ensaio clínico de fase I (NCT03307148) no qual se testou a associação de ATRA com *gemcitabina/nab-paclitaxel* em 27 pacientes com PDAC em estágio III/IV.⁶¹ O regime provou ser seguro e a OS média foi de 11.7 meses. Os resultados deste estudo validaram a avaliação desta associação num ensaio clínico de fase II, a decorrer (NCT04241276).⁶¹

Vitamina D

A estimulação do recetor da vitamina D (VDR), altamente expresso por CAFs ativos, demonstrou capacidade para o bloqueio destas células.⁶² Em amostras *in vitro*, a administração de calcipotriol, um análogo da vitamina D, suprimiu significativamente as propriedades malignas induzidas por CAFs e, em modelos animais de PDAC, a administração de calcipotriol e gemcitabina aumentou a sobrevivência em 57%, relativamente à administração de quimioterapia.⁶² Estes achados sustentaram a realização de ensaios clínicos para testar o efeito de paricalcitol (análogo da vitamina D), com imunoterapia e em monoterapia (NCT03331562 e NCT03300921, respetivamente).⁴⁹

1.2. Microambiente imunossupressor

O PDAC desenvolve-se num microambiente imunossupressor. Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), essenciais na imunidade antitumoral, são ativados por interação com neoantígenos tumorais expostos no complexo *major* de histocompatibilidade-I (MHC-I). O MHC-I está presente na superfície de células tumorais e de células apresentadoras de antígenos (APCs).

Linfócitos T CD8⁺ ativados induzem apoptose de células tumorais através da secreção de perforinas, granzimas e da expressão do ligando Fas. No PDAC, há inibição da ativação de linfócitos T CD8⁺ por diminuição da expressão de MHC-I na superfície das células tumorais. Ocorre também resistência à apoptose mediada por Fas, por diminuição da sua expressão nas células tumorais. Citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , são secretadas por elementos do TME e contribuem para o recrutamento de células envolvidas na evasão ao sistema imunitário.⁶³ As células tumorais sobreexpressam indolamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1), fator de transcrição *Forkhead box P3* (Foxp3), CTLA-4 e PD-1, que estimulam a imunossupressão através da inibição da função de células T efectoras e, no caso do Foxp3, através da acumulação de células T reguladoras (Treg) no TME.^{27,63} Tregs, identificadas como CD4⁺ CD25⁺ e definidas pela expressão de Foxp3, participam na manutenção da tolerância imunológica a autoantígenos e na promoção da homeostasia das células imunes, através do controlo da indução e proliferação de células T efectoras.²⁷

Modelos pré-clínicos demonstraram que, numa fase precoce da carcinogénese, estão presentes células infiltrativas imunossupressoras no TME: TAMs, Tregs e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs), que compreendem uma população heterogénea de células mielóides imaturas com atividade imunossupressora.⁶⁴ Estas bloqueiam a infiltração de células T efectoras e promovem o aumento da expressão de moléculas de *checkpoints* imunes,⁶⁴ diminuindo a imunidade antitumoral. Com base nestes achados, surge a hipótese de que a diminuição destas células possa incrementar a resposta do sistema imune ao PDAC.

1.2.1. Macrófagos associados ao tumor (TAMs)

Os macrófagos são APCs que podem diferenciar-se em dois fenótipos, M1 e M2. No PDAC existem os dois subtipos de macrófagos associados ao tumor (TAMs), sendo que a quantidade de cada um é variável. O fenótipo M1, é pró inflamatório, tem atividade antitumoral e predomina nas fases iniciais da carcinogénese. Com a progressão da doença, o subtipo dominante é o M2, que tem atividade anti-inflamatória e promove crescimento e invasão tumoral.^{50,65} VEGF e diversas citocinas promovem o recrutamento de TAMs para o TME. No TME, os TAMs M2 secretam citocinas (IL-10, TGF- β), quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas, que induzem progressão tumoral por inibição da atividade de linfócitos T CD8⁺, recrutamento de Tregs, angiogénese, invasão tumoral, apoptose de células imunes efectoras por expressão de PD-L1 e desmoplasia, por estimulação de PSCs.^{27,65}

Agonistas CD40

CD40 é um recetor coestimulatório encontrado na superfície de APCs, como os macrófagos. Ao estabelecer ligação com o seu ligando, CD40L, promove apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T CD8⁺.⁶⁶ Em modelos animais de PDAC, a estimulação de CD40 revelou aumento da expressão de CD86 e de moléculas MHC-II por TAMs, exacerbação da sua atividade tumoricida e involução do estroma, com regressão tumoral.^{66,67} Posto isto, ao invés da depleção de TAMs, a otimização da sua atividade antitumoral, através de agonistas CD40, poderá ser uma estratégia terapêutica.

APX005M, um mAb agonista de CD40, está a ser testado num ensaio clínico de fase I/II (NCT03214250), em associação com *gemcitabina/nab-paclitaxel* ± nivolumab (mAb anti PD-1).⁶⁶ O ensaio inclui 129 pacientes com PDAC em estágio IV. Os resultados preliminares são promissores com uma ORR de 54% (a ORR de *gemcitabina/nab-paclitaxel*, com e sem nivolumab, numa amostra semelhante varia entre 18-23%).⁶⁶ O estudo encontra-se ainda a decorrer.⁶⁷

Inibidores do recetor do fator estimulante de colónias-1 (CSF-1R)

Recetor do fator estimulante de colónias-1 (CSF-1R) é um recetor transmembranar, cuja ligação ao fator estimulante de colónias-1 (CSF-1) ativa vias de sinalização intracelulares. Esta ativação promove a diferenciação, propagação, sobrevivência e migração de TAMs e MDSCs. A sobreexpressão de CSF-1R/CSF-1 no PDAC associa-se a imunossupressão e prognóstico precário, logo, a sua inibição poderá potenciar a atividade antitumoral, como verificado em ensaios pré-clínicos.^{64,68}

Encontra-se em estudo o bloqueio de CSF-1R/CSF-1 por pequenas moléculas inibidoras que, pelo reduzido peso molecular (≤ 500 Da), atravessam a membrana celular, atingem o citoplasma e anulam proteínas intracelulares específicas, interferindo com mecanismos de sinalização.⁶⁸ Em modelos animais de PDAC xenotransplantados, o uso da pequena molécula inibidora de CSF-1R, PLX3397, demonstrou depleção de TAMs M2 no TME, reprogramação dos restantes TAMs para o fenótipo antitumoral e aumento da expressão de *checkpoints* imunes.⁶⁹ Na sequência destes resultados, a adição de antagonistas de PD-1 e CTLA-4 a PLX3397 foi testada e verificou-se uma redução da progressão tumoral superior a 90%, o que suporta observações prévias de que a terapêutica com pequenas moléculas inibidoras de CSF-1R potencia a terapêutica com ICI.⁶⁹ Ensaio clínico, como NCT02777710 e NCT02880371, realizados com estas moléculas confirmaram os benefícios da associação

desta terapêutica com imunoterapia. O ensaio de fase I/II, NCT02829723, está a testar o efeito da associação da pequena molécula inibidora, BLZ945, a PDR001, um antagonista PD-1.⁶⁸

Outras estratégias terapêuticas estão a ser exploradas para o bloqueio do CSF-1R. Li *et al.*, desenvolveram uma nanomicela (sistema de entrega de fármacos) específica para TAMs M2, criada para fazer chegar um inibidor a PI3K- δ (NVP-BEZ 235) e um pequeno RNA de interferência (siRNA) a CSF-1R, num modelo de PDAC.⁶⁴ Como PI3K- δ é uma cinase cuja supressão diminui a acumulação de MDSCs e estimula a reprogramação de TAMs, testou-se a hipótese de que este bloqueio duplo poderia potenciar a imunidade antitumoral.⁷⁰ Os resultados revelaram reprogramação dos TAMs do fenótipo M2 para M1 e diminuição da infiltração de MDSCs, com suspensão parcial do microambiente imunossupressor e cessação do crescimento tumoral.⁶⁴ Este estudo evidencia que a reprogramação de TAMs é mais eficaz quando realizada por mais do que um mecanismo.

Para intensificar as respostas clínicas obtidas, estão a decorrer ensaios clínicos com associação de imunoterapia e/ou quimioterapia ao bloqueio do CSF-1R. O ensaio clínico de fase I, NCT03153410, (**Tabela 4**) está a decorrer com o objetivo de avaliar o efeito do mAb anti CSF-1R, IMC-CS4, em combinação com GVAX (vacinas antitumorais modificadas para exprimirem fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)),²⁸ ciclofosfamida e pembrolizumab (mAb anti PD-1).²⁹

Inibidores do recetor de quimiocinas CC 2 (CCR2)

A modulação das vias de sinalização das quimiocinas é uma possível abordagem para reduzir a infiltração de TAMs no TME. A expressão de ligando de quimiocinas CC 2 (CCL2) pelo tumor, recruta monócitos inflamatórios positivos para o recetor de quimiocinas CC 2 (CCR2⁺) para o estroma, onde se diferenciam em TAMs imunossupressores.⁷¹ A elaboração de ensaios clínicos com inibidores CCR2 surgiu devido à exacerbação da resposta antitumoral aquando do seu bloqueio em modelos animais de PDAC.

O ensaio de fase Ib, NCT01413022, incluiu 44 pacientes com PDAC em estágio II/III. Neste ensaio testou-se a associação de *FOLFIRINOX* com a pequena molécula inibidora de CCR2, PF-04136309. O regime provou ser seguro e bem tolerado e a proporção de pacientes a atingir resposta parcial foi significativamente superior no grupo experimental, relativamente ao grupo controlo (48.5% vs 25%, respetivamente).⁷² Apurou-se também que houve redução da quantidade de monócitos inflamatórios CCR2⁺ circulantes e da infiltração de TAMs no tumor primário.⁷² A diminuição de TAMs foi associada a influxo compensatório de neutrófilos

associados ao tumor (TANs), o que pode contribuir para a falência da terapêutica com inibidores CCR2.⁷³ Por esta resposta compensatória e pelos resultados promissores do bloqueio de CCR2, foi testado o benefício terapêutico da inibição de TAMs CCR2⁺ e de TANs CXCR2⁺ ± quimioterapia.⁷¹ Esta associação demonstrou resposta a quimioterapia com *FOLFIRINOX* superior à obtida com qualquer um destes inibidores em monoterapia, e aumento da imunidade antitumoral, com intensificação da infiltração de linfócitos T efetores no TME.⁷¹ Estes achados sugerem que o bloqueio duplo de TAMs e TANs representa uma estratégia terapêutica com potencial para debelar o microambiente imunossupressor.

A inibição de CCR2 está a ser investigada em múltiplos ensaios clínicos. No ensaio de fase I/II, NCT03184870, está a testar-se uma pequena molécula inibidora de CCR2 (BMS-813160) com nivolumab ou quimioterapia. No ensaio de fase I, NCT02345408, está a ser averiguado o benefício de um antagonista de CCR2 (CCX872), em monoterapia.

1.2.2. Células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs)

A produção de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs) é regulada por diversos fatores solúveis, de entre eles, o GM-CSF. No PDAC, o GM-CSF é excessivamente produzido por células tumorais e estromais, o que estimula a diferenciação de progenitores mielóides em MDSCs, a sua migração e acumulação no tumor.⁵⁰

No TME, MDSCs medeiam a progressão tumoral por interferência em diversas vias de sinalização intracelular, com aumento da produção de espécies reativas de oxigénio e intensificação da expressão da sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS), suprimindo a atividade e induzindo a apoptose dos linfócitos T citotóxicos por inibição de JAK3, STAT5 e da expressão de moléculas de MHC-II.⁷⁴ A inibição da ação e da infiltração de células T efetoras por MDSCs ocorre também através da depleção de L-arginina por expressão de arginase-1 (Arg-1), indução da expressão de PD-L1 nas células tumorais e recrutamento de Tregs.^{8,75} As MDSCs estimulam ainda a progressão tumoral, angiogénese, metastização e quimiorresistência.

Agentes redutores de MDSCs demonstraram benefício na reposição da imunidade antitumoral e aumento da eficácia da imunoterapia, no PDAC.⁷⁴ De destacar que a mielossupressão é um efeito secundário reportado em diversos regimes de quimioterapia, estando demonstrado que os níveis de MDSCs diminuem após tratamento com gemcitabina.⁷⁶

BL-8040

A interação entre a CXCL12, produzida por CAFs, e o recetor CXCR4, presente em células imunes, promove o recrutamento de MDSCs para o tumor.⁸ Como referido, estas moléculas participam na modulação do TME e a sua inibição aumenta a resposta a imunoterapia com ICI.⁷⁷

Com base nestas observações, foi conduzido um ensaio clínico de fase IIa, NCT02826486, com 37 pacientes com PDAC em estágio IV previamente tratado, onde se testou a associação do antagonista CXCR4, BL-8040, a pembrolizumab e quimioterapia.⁷⁷ No grupo que recebeu a associação como terapêutica de 2ª linha, a OS média foi de 7.5 meses. Este resultado é uma comparação favorável relativamente ao único regime de quimioterapia aprovado como 2ª linha no tratamento do PDAC metastático, cuja OS média é de 6.1 meses.⁷⁸ Para além dos efeitos clínicos neste grupo específico, também os efeitos imunobiológicos devem ser salientados. A associação diminuiu a densidade de MDSCs intratumorais, aumentou a infiltração e ativação de linfócitos T citotóxicos e suprimiu significativamente a frequência de linfócitos T efetores PD-1+, sendo que, a supressão foi mais acentuada nos pacientes que experimentaram maior taxa de controlo da doença.⁷⁷ Os achados sustentam as observações pré-clínicas e sugerem que este bloqueio duplo tem efeitos antitumorais e que pode aumentar o benefício da quimioterapia no PDAC. Aguardam-se estudos adicionais que suportem estes resultados.

Entinostat

Em modelos experimentais, a associação de entinostat a ICI demonstrou resposta imune robusta, com diminuição da capacidade imunossupressora de MDSCs. Concluiu-se que a administração de entinostat modifica a atividade de MDSCs, intensifica a infiltração tumoral de células T e aumenta a sensibilidade de tumores não imunogénicos a ICI.⁷⁵ A associação de entinostat a nivolumab encontra-se a ser testada num ensaio clínico de fase II, em pacientes com PDAC em estágio III/IV (NCT03250273).⁷⁵

Os resultados obtidos com a modulação de MDSCs validam a sua investigação como alvo terapêutico. Estes achados sugerem que a combinação de terapêutica supressora de MDSCs com imunoterapia poderá resultar na otimização de regimes que, até ao momento, ainda não foram bem sucedidos no tratamento do PDAC.

1.2.3. Células T reguladoras (Tregs)

As células T reguladoras (Tregs) exercem a sua função através de múltiplos mecanismos, entre eles, a produção de citocinas imunossupressoras (TGF- β , IL-10, IL-35), a expressão de moléculas reguladoras de *checkpoints* imunes (CTLA-4), a indução de toxicidade direta mediada por perforinas e granzimas, a inibição da maturação e função de células dendríticas²⁴ e a alteração metabólica da atividade de células T efectoras através do consumo de IL-2.⁷⁹ A abundância de células Treg Foxp3⁺ infiltrativas está reportada no PDAC e associa-se a pior prognóstico. Através da expressão constante de CTLA-4 por Tregs e dos restantes mecanismos referidos, estas células contribuem para a supressão da imunidade antitumoral e manutenção do microambiente imunossupressor, promovendo a evasão imune e a progressão do PDAC.^{24,79} Assim, as Tregs tornaram-se num alvo terapêutico promissor, motivando a investigação de diversas abordagens terapêuticas.

Mogamulizumab

O recetor de quimiocinas CC 4 (CCR4), predominantemente expresso por Tregs, reconhece dois ligandos, o ligando de citocinas CC 17 (CCL17) e o ligando de citocinas CC 22 (CCL22).⁸⁰ A produção destas citocinas por células tumorais promove o recrutamento de Tregs CCR4⁺ para o TME.⁸⁰ Desta forma, CCR4 tornou-se um potencial alvo terapêutico.

Mogamulizumab, um mAb anti CCR4, provocou redução de Tregs no sangue periférico de pacientes com tumores sólidos. Num ensaio clínico de fase I com 64 pacientes, foi testada a associação de mogamulizumab a ICI, em pacientes com tumores sólidos (incluindo PDAC), em estágio avançado.⁸¹ Este ensaio sustentou os achados dos ensaios pré-clínicos, pois a administração de mogamulizumab reduziu significativamente a quantidade de Tregs no sangue periférico e, de forma variável, no tumor.⁸¹ No entanto, com ORR de 5.3%, a redução de Tregs não se traduziu em resposta clínica.⁸¹

Existem diversas estratégias que promovem a diminuição dos níveis de Tregs ou inibem a sua ação imunossupressora. Entre estas, como referido, o bloqueio de mediadores solúveis secretados por Tregs, como TGF- β , demonstrou ser uma abordagem terapêutica promissora. Também o efeito de quimioterapia com baixa dose de ciclofosfamida na depleção de Tregs, no TME e sangue periférico, está bem estabelecido.⁷⁹

2. Inibidores de *checkpoints* imunes (ICI)

O sistema imunitário consegue distinguir constituintes do hospedeiro (*self*) de constituintes externos ao organismo (não *self*). Como mencionado, para evitar fenómenos de autoimunidade, os linfócitos T passam por *checkpoints* imunes. CTLA-4 e PD-1 são dois *checkpoints* imunes que atuam em diferentes fases da resposta imunológica e a sua inibição exacerba a atividade do sistema imune.⁵⁵

O tratamento com inibidores de *checkpoints* imunes (ICI) demonstrou resposta clínica em vários tumores sólidos como melanoma, carcinoma do pulmão de não pequenas células e carcinoma de células renais.⁸² Apesar de a maioria dos tumores pancreáticos serem refratários à monoterapia com ICI, parece haver efeito sinérgico, com aumento da taxa de resposta, quando se combina a imunoterapia com outros regimes terapêuticos.²⁸ Assim, o sucesso do uso de mAb poderá depender da utilização concomitante de agentes imunomoduladores e modificadores do estroma. Desta forma, poderá ser possível aumentar a penetração destes anticorpos no TME.

2.1. Proteína citotóxica 4 associada a linfócitos T (CTLA-4)

A proteína citotóxica 4 associada a linfócitos T (CTLA-4) é um recetor inibitório expresso em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que exerce a sua função nos estádios iniciais de ativação de linfócitos T, nos gânglios linfáticos.⁵⁵

A ativação de linfócitos T requer mais do que um sinal estimulatório. A ligação do recetor da célula T a um peptídeo no MHC providencia especificidade para a ativação destas células mas, para a amplificação desse sinal, é necessária a ligação do co-recetor CD28 a B7-1 ou a B7-2, moléculas presentes na superfície das APCs.⁵⁵ Quando em quantidade suficiente, a ligação CD28:B7-1/2 aumenta a produção de IL-2, promovendo a proliferação, aumento da sobrevivência e diferenciação de linfócitos T.^{55,83} O CTLA-4 tem maior afinidade para B7-1/2 do que o CD28. Desta forma, a sua acumulação na membrana das células T inibe competitivamente a ligação CD28:B7-1/2, substituindo o sinal co-estimulatório e bloqueando a acumulação de IL-2.⁸³

A ação de CTLA-4 atenua a resposta imune. Para além de exercer uma ação inibitória sobre linfócitos T citotóxicos, o CTLA-4 é produzido de forma constitutiva por Tregs CD4⁺ através do fator de transcrição Foxp3⁺, participando na ativação destas células.⁸³

O bloqueio de CTLA-4 diminui a atividade supressora de Tregs e ativa linfócitos T efetores, induzindo imunidade antitumoral.^{20,83}

Ipilimumab

Ipilimumab é um mAb totalmente humano, do tipo IgG1, que bloqueia o CTLA-4. Em 2011 foi aprovado para uso clínico na Europa e nos EUA.^{28,82}

O tratamento com ipilimumab mostrou atividade e aumento da OS em pacientes com melanoma metastático.^{82,84} No entanto, num ensaio clínico de fase II (NCT00112580), em que o seu efeito foi avaliado em 27 pacientes com carcinoma pancreático em estágio IV, os resultados foram desanimadores, não tendo ocorrido melhoria da sobrevivência.^{20,82}

Apesar da ausência de evidência que suporte o uso de ipilimumab em monoterapia no tratamento de adenocarcinoma pancreático, a sua combinação com outros agentes terapêuticos revelou resultados mais promissores.

A associação de ipilimumab e gemcitabina foi avaliada num ensaio clínico de fase Ib, que incluiu 21 pacientes com adenocarcinoma pancreático em estágio III/IV.⁸⁴ A OS média (6.9 meses) foi semelhante à atingida aquando da administração de gemcitabina em monoterapia, no entanto, a associação provou ser segura e bem tolerada e a duração das respostas obtidas sugere que a ativação do componente imune no tratamento do PDAC é uma área que deve ser mais profundamente investigada.^{28,84}

A combinação de ipilimumab com a vacina GVAX revelou aumento da OS comparativamente à administração de ipilimumab em monoterapia.^{20,85} Em contraste, a administração de ipilimumab com GVAX, em contexto de terapêutica de manutenção após quimioterapia com *FOLFIRINOX*, não demonstrou aumento da sobrevida no grupo experimental.⁸⁵ No entanto, ocorreu aumento da resposta imune a nível periférico e intratumoral. Isto sugere que este regime desencadeia um efeito biológico com potencial para induzir resposta antitumoral, abrindo caminho para a realização de ensaios mais robustos.⁸⁵

A associação de ipilimumab e nivolumab encontra-se em estudo num ensaio clínico de fase I/II, NCT01928394, em pacientes com tumores sólidos, incluindo adenocarcinoma pancreático. Dois ensaios de fase II, também a decorrer (NCT02866383 e NCT03104439), pretendem determinar os efeitos da associação de ipilimumab com nivolumab e radioterapia, também em pacientes com adenocarcinoma pancreático.^{86,87}

Tremelimumab

Tremelimumab é um mAb humano IgG2, com atividade anti CTLA-4. A sua administração em regime de monoterapia, num ensaio clínico de fase II, NCT02527434, que incluiu 20 pacientes com PDAC em estágio III/IV, não demonstrou resposta tumoral, com OS média de 4 meses.²⁸ Num ensaio clínico de fase I (NCT00556023), em que participaram 34 pacientes com carcinoma pancreático de estágio IV, foi testada a combinação de tremelimumab com gemcitabina. Apesar de a OS média ter sido de 7.4 meses, o ensaio terminou com boa tolerabilidade, abrindo porta para a realização de ensaios mais complexos.⁸⁸

O ensaio clínico de fase I, NCT02879318, a decorrer, tem como objetivo primário testar a OS resultante da associação de *gemcitabina/nab-paclitaxel* ± tremelimumab + durvalumab (mAb anti PD-L1), em pacientes com PDAC em estágio IV.⁸⁹

2.2. Proteína da morte celular programada-1 (PD-1)

A proteína da morte celular programada-1 (PD-1) é um recetor de superfície presente em linfócitos T ativados, linfócitos B e células mielóides. Esta proteína regula negativamente a atividade de linfócitos T através da ligação aos seus ligandos, ligandos da proteína da morte celular programada-1/2 (PD-L1/2). Contrariamente ao CTLA-4, o recetor PD-1 atua numa fase tardia da resposta imune (fase efetora), nos tecidos periféricos.⁵⁵ A ligação de PD-1 aos seus ligandos inibe a proliferação e a sobrevivência de células T e diminui a produção de interferão alfa (IFN- α), TNF- α e IL-2.⁵⁵

O PD-L1, expresso no PDAC por células tumorais e células imunes infiltrativas, inibe a atividade de linfócitos T efetores no TME. A sobreexpressão de PD-L1 por tumores sólidos constitui um mecanismo adaptativo que facilita a evasão do tumor ao sistema imune.⁹⁰

Tumores pancreáticos que expressam PD-L1 associam-se a pior prognóstico. Duas meta-análises efetuadas para determinar o valor prognóstico de PD-L1 no PDAC revelaram que maior expressão de PD-L1 no TME se associa a menor OS, a estádios mais avançados da doença e a tumores menos diferenciados.^{90,91} Desta forma, a sobreexpressão de PD-L1 pode constituir-se como um potencial biomarcador para a previsão da sobrevivência e da agressividade da doença em pacientes com PDAC.^{90,91}

O bloqueio da interação entre estas moléculas, em ensaios pré-clínicos, revelou diminuição do crescimento tumoral e aumento da sobrevivência, o que providencia a base para o uso de

mAb anti PD-1/PD-L1 na promoção da ativação de linfócitos T efetores e na indução de respostas antitumorais.⁵⁵

No entanto, dados clínicos demonstram que o uso de antagonistas PD-1/PD-L1 apresentam atividade limitada ou nula, quando testados em regime de monoterapia, no PDAC.⁹² Posto isto, os esforços foram direcionados para a investigação de terapêuticas combinadas.

Pembrolizumab

Pembrolizumab é um mAb anti PD-1 aprovado pela FDA para o tratamento de vários tumores sólidos, como melanoma e carcinoma do pulmão de não pequenas células.⁸²

A associação de pembrolizumab e *gemcitabina/nab-paclitaxel* em pacientes com tumores metastizados foi testada num ensaio clínico de fase Ib/II (NCT02331251). Dos 49 pacientes incluídos, 11 tinham carcinoma pancreático. O regime provou ser seguro e a OS e a PFS foram ligeiramente superiores às atingidas com o regime de *gemcitabina/nab-paclitaxel*.⁹³

Com base em ensaios pré-clínicos promissores, foi testada a associação de pembrolizumab com acalabrutinib, um inibidor da tirosina cinase de Bruton (BTK).⁹² O ensaio de fase II, NCT02362048, demonstrou a segurança do regime, no entanto, a atividade clínica foi limitada. Verificou-se ainda diminuição da densidade de MDSCs à periferia, no entanto, sem significado estatístico.⁹²

A combinação de pembrolizumab com radioterapia, NCT02303990, foi avaliada num ensaio clínico de fase I, com 60 participantes com tumores sólidos localmente avançados ou metastizados (incluindo carcinoma pancreático), ainda sem resultados divulgados. Ensaio clínico, a decorrer, testam a administração de pembrolizumab em monoterapia (NCT02054806) e também a sua associação a azacitidina, fármaco citotóxico que induz hipometilação do DNA (NCT03264404).⁸⁶

O pembrolizumab está aprovado pela FDA para o tratamento de um grupo específico de doentes. Estes doentes expressam um fenótipo tumoral de instabilidade de microssatélites por défice do sistema de reparação de DNA “*mismatch repair*” (MMR), cuja incidência varia entre 1 a 2%.⁹⁴ A presença de défice no MMR está associada a uma maior taxa mutacional e a uma maior sensibilidade para ICI, o que pode ser explicado por, nos tumores com instabilidade de microssatélites, a síntese de antigénios tumorais ser 10 a 20 vezes superior à verificada em tumores sem esta alteração.⁹⁴ Devido à eficácia da terapêutica com

pembrolizumab nestes tumores (taxa de resposta de 62% e doença estável de 12%⁸⁹), é recomendado que pacientes com PDAC em estádios avançados sejam testados para deficiência de MMR.⁸⁶

Nivolumab

Nivolumab é um mAb anti PD-1 aprovado para o tratamento de melanoma metastático e de cancro do pulmão de não pequenas células metastático.^{55,82}

O nivolumab foi analisado em associação a cabiralizumab num ensaio clínico de fase I com 33 pacientes com PDAC previamente tratado. A ORR de 13% motivou a realização de um ensaio de fase II (NCT03336216), a decorrer, para testar a associação de nivolumab e cabiralizumab ± quimioterapia.^{86,89}

O ensaio clínico de fase II, NCT02243371, foi realizado para determinar o potencial terapêutico da associação de nivolumab à terapêutica com GVAX/ciclofosfamida e CRS-207.⁹⁵ CRS-207 é uma forma atenuada de *Listeria monocytogenes* que expressa mesotelina, um antígeno de superfície não detetado no pâncreas normal, mas sobreexpresso no PDAC.^{96,97} A adição de nivolumab à terapêutica tripla não prolongou a OS. No entanto, no grupo experimental verificou-se expansão de linfócitos T CD8⁺ funcionais e diminuição da densidade de MDSCs e de TAMs.⁹⁵ Posto isto, os autores concluem que as alterações imunológicas verificadas no sangue periférico e no TME suportam a continuidade de estudos que combinem regimes de imunoterapia.⁹⁵

A associação de paricalcitol, nivolumab e gemcitabina/nab-paclitaxel/cisplatina encontra-se a ser avaliada num ensaio clínico de fase II, NCT02754726.⁸⁷ Outros ensaios clínicos com nivolumab são referidos ao longo deste trabalho.

3. Transferência adotiva de células T (ACT)

A transferência adotiva de células T (ACT) é uma técnica cuja finalidade é ampliar a resposta imunitária. Imunoterapia com células T que expressam recetor quimérico de antígenos (CAR-T) é a forma de ACT mais desenvolvida clinicamente.^{28,96} Nesta técnica, os linfócitos T são geneticamente modificados de forma a exprimirem na sua superfície uma proteína transmembranar que corresponde a um recetor quimérico de antígenos (CAR), específico para antígenos tumorais.⁹⁷ O CAR providencia o duplo sinal estimulatório para a ativação de linfócitos, ultrapassando assim o mecanismo de evasão tumoral que consiste na restrição da

expressão do MHC-I nas células tumorais.⁹⁷ A terapêutica com células CAR-T está aprovada pela FDA para o tratamento de formas refratárias de linfoma difuso de grandes células B e para a leucemia linfoblástica aguda.⁸⁶ A aplicação desta técnica no tratamento de tumores sólidos tem sido explorada e demonstrou benefício no tratamento de tumores como o glioblastoma, neuroblastoma e osteossarcoma.⁹⁶

Em modelos pré-clínicos, a terapêutica com CAR-T demonstrou eficácia no tratamento do PDAC, promovendo a realização de ensaios clínicos.⁹⁸ No entanto, nos ensaios clínicos, a aplicação de CAR-T no tratamento de PDAC não revelou resposta clínica significativa nem aumento da OS.⁹⁹ A ausência de eficácia pode ser explicada pela ausência de alvos específicos expressos pelas células tumorais. As células CAR-T exercem a sua ação em todas as células com determinado grau de expressão do antigénio, originando fenómenos de toxicidade externos ao tumor.⁹⁹ Também a heterogeneidade da expressão de alvos no PDAC constitui um obstáculo pois faz com que, por vezes, estes estejam presentes em apenas 20% das células tumorais.⁵⁷ Desta forma, a progressão da doença ocorre à custa das células tumorais negativas para esse alvo. Daqui surge a necessidade de estratégias que assegurem o atingimento específico de todas as células tumorais.⁵⁷

Apesar disto, a ausência de resposta é, em grande parte, devida à barreira física e ao ambiente imunossupressor imposto pelo TME, que atenua a infiltração e a eficácia desta terapêutica.⁵⁷ Para ultrapassar estes obstáculos terão de ser desenvolvidos protocolos que combinem a aplicação de células CAR-T com terapêuticas dirigidas aos componentes do TME.

É também imperativa a determinação de biomarcadores que permitam ultrapassar estas limitações, pelo que se encontram em estudo vários alvos possíveis para a aplicação desta técnica com sucesso no tratamento do adenocarcinoma pancreático.

Mesotelina

A mesotelina é um antigénio de superfície expresso, em pouca quantidade, em células mesoteliais localizadas em estruturas como a pleura, o pericárdio e o peritoneu. Em contraste, a mesotelina encontra-se sobreexpressa em vários cancros, incluindo o cancro do pâncreas. Este antigénio é indetetável no pâncreas normal, no entanto, está sobreexpresso em, aproximadamente, 75 a 85% das células tumorais do PDAC, tornando-o num alvo adequado para a terapêutica dirigida com linfócitos T.^{96,97}

No PDAC, a sobreexpressão de mesotelina está associada a pior prognóstico e a recidiva pós-operatória. Há ainda evidências que sugerem que a mesotelina tem papel promotor da malignidade, ao inibir a apoptose induzida pelo TNF- α e ao estimular a migração e invasão de células tumorais.⁹⁷

Em ensaios pré-clínicos, a aplicação de células CAR-T-mesotelina provocou apoptose de células tumorais de PDAC, *in vitro*, e a inibição do crescimento subcutâneo do tumor *in vivo*.⁹⁸ Demonstrou também eficácia na eliminação de metástases pulmonares cujo tumor primário estava localizado no pâncreas.⁹⁸ Posto isto, existem vários ensaios clínicos (**Tabela 3**) a testar terapêutica com células CAR-T-mesotelina no PDAC.⁵⁷

Mucina 1

A mucina 1 (MUC1) é uma glicoproteína transmembranar expressa na superfície de células epiteliais. Aproximadamente 85% dos adenocarcinomas pancreáticos expressam uma forma aberrante de MUC1 (tMUC1), que é associada a fenómenos de oncogénese e a metastização e, como tal, marcadora de pior prognóstico.¹⁰⁰

Yazdanifar et al. desenvolveram células CAR-T utilizando fragmentos variáveis de um mAb, TAB004, com especificidade para tMUC1, mas sem especificidade para células epiteliais normais.¹⁰¹ Num ensaio clínico testou-se a atividade de células CAR-T derivadas de TAB004 num painel de linhas celulares de PDAC. Células CAR-T-tMUC1 demonstraram elevada capacidade para detetar e destruir células tumorais e limitaram o crescimento de tumores pancreáticos, em modelos ortotópicos *in vivo*. Algumas linhas celulares demonstraram resistência à terapêutica. Os dados revelaram que genes, como IDO1, estavam implicados nessa resistência e que o bloqueio destes genes potenciava a ação de células CAR-T-tMUC1.¹⁰¹ Os resultados deste estudo corroboram a hipótese de que tMUC1 é um alvo com potencial terapêutico no adenocarcinoma pancreático.

Múltiplos ensaios clínicos, completos e a decorrer (**Tabela 3**), procuram testar o potencial de diversas moléculas como alvo de células CAR-T no tratamento do PDAC e outras neoplasias sólidas.^{57,96}

Tabela 3. Ensaios clínicos que testam a terapêutica com células CAR-T

Identificação	Alvo terapêutico	Fase
NCT03323944	Mesotelina	I
NCT03497819	Mesotelina	I
NCT01897415	Mesotelina	I
NCT01583686	Mesotelina	I/II
NCT02541370	CD133	I/II
NCT02744287	PSCA	I/II
NCT03267173	HER2	I
NCT01935843	HER2	I/II
NCT03818165	CEA	I
NCT04037241	CEA	II/III
NCT02850536	CEA	I
NCT03682744	CEA	I

CAR-T: Células T que expressam recetor quimérico de antigénios. **CEA:** antigénio carcinoembrionário. **HER2:** recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2. **PSCA:** antigénio das células estaminais da próstata.

4. Vacinação

As vacinas antitumorais têm como objetivo estimular e amplificar a atividade do sistema imunitário através da apresentação de antigénios tumorais promotores da proliferação e ativação de linfócitos T citotóxicos, específicos para esses antigénios.¹⁰² Há diversos tipos de vacinas tumorais terapêuticas para o PDAC, como vacinas de células tumorais, vacinas de peptídeos e vacinas de células dendríticas.¹⁰³ No PDAC, vacinas de células tumorais, particularmente as GVAX, são as mais estudadas e com resultados mais promissores.

4.1. Vacinas de células tumorais totais

As vacinas de células tumorais totais são formuladas a partir de células tumorais modificadas, autólogas ou alogénicas, utilizadas como fonte de antigénios para induzir uma resposta antitumoral.¹⁰³ A vantagem do uso destas vacinas é a exposição do sistema imunitário a uma maior diversidade de antigénios tumorais, minimizando a evasão imune.

Vacinas modificadas para exprimirem GM-CSF (GVAX)

Células tumorais geneticamente modificadas para produzirem citocinas imunogénicas induzem respostas imunes sistémicas antitumorais e têm sido ativamente investigadas. Fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), é uma citocina envolvida no recrutamento e ativação de células dendríticas, promovendo a apresentação de antigénios tumorais por estas células e, conseqüentemente, imunidade antitumoral por ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.^{103,104} A aplicação de vacinas modificadas para exprimirem GM-CSF (GVAX) em ensaios de fase I e II demonstrou que esta vacina é segura e bem tolerada. No entanto, por infiltração compensatória de Tregs, a vacina pode administrada juntamente com ciclofosfamida em baixa dose.¹⁰⁵

CRS-207 é uma vacina que, no citoplasma de APCs infetadas, secreta mesotelina que, por sua vez, é processada e apresentada no MHC. GVAX induz a formação de células T específicas para diversos antigénios tumorais, incluindo a mesotelina. Num ensaio de fase I, pacientes que receberam CRS-207 antes da terapêutica com GVAX demonstraram uma OS média 12 meses superior à dos pacientes que receberam apenas GVAX.¹⁰⁶

Foi realizado um ensaio clínico de fase II para testar a combinação GVAX/Cy ± CRS-207, em 90 pacientes com PDAC de estágio IV, previamente tratado (NCT01417000).¹⁰⁶ A terapêutica tripla demonstrou uma OS mais prolongada (6.1 vs 3.9 meses), com toxicidade mínima. Verificou-se ainda um aumento de linfócitos T CD8⁺ específicos para mesotelina, o que se correlacionou com um aumento da OS, independentemente de terem recebido CRS-207.¹⁰⁶ A administração de GVAX/Cy + CRS-207 aumenta de forma significativa a OS.

Com base nestas observações, foi realizado um ensaio clínico de fase IIb, em 303 pacientes com PDAC de estágio IV, para testar a associação GVAX/Cy + CRS-207 comparativamente a quimioterapia, em pacientes com PDAC previamente tratado (NCT02004262).¹⁰⁷ No entanto, os resultados revelaram que a terapêutica tripla, apesar de bem tolerada, não aumentou a OS relativamente à quimioterapia (3.7 vs 4.6 meses, respetivamente).¹⁰⁷

O tratamento com GVAX/Ciclofosfamida induz a formação de agregados linfóides, a produção de INF- α por linfócitos T CD8⁺ e promove a infiltração de linfócitos T citotóxicos específicos para antigénios tumorais no TME, o que se correlaciona com aumento da sobrevida.¹⁰⁸ No entanto, como resposta, são desencadeados mecanismos de resistência adaptativa, como o aumento da expressão de PD-L1 no TME, o que suprime a atividade dos linfócitos T

infiltrativos. ¹⁰⁸ Para contornar este obstáculo, está a ser investigada a associação de GVAX e ICI (**Tabela 4**), em vários ensaios clínicos. ¹⁰⁹

Tabela 4. Alguns ensaios clínicos atualmente a investigar a associação de GVAX e ICI

Identificação	Intervenção	Fase
NCT02648282	Ciclofosfamida, GVAX, Pembrolizumab, SBRT	II
NCT03190265	Ciclofosfamida, Nivolumab, Ipilimumab, GVAX, CRS-207	II
NCT03153410	Ciclofosfamida, GVAX, Pembrolizumab, IMC-CS4	I
NCT03006302	Epacadostat, Pembrolizumab, Ciclofosfamida, CRS-207, GVAX	II
NCT02451982	Ciclofosfamida, GVAX, Nivolumab, Urelimab	I/II
NCT03161379	Ciclofosfamida, GVAX, Nivolumab, SBRT	II

ICI: Inibidores de *checkpoints* imunes. **GVAX:** Vacinas modificadas para exprimirem fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (**GM-CSF**). **SBRT:** Radioterapia esterotáxica corporal.

Conclusão

O cancro do pâncreas permanece um cancro altamente letal com uma taxa de sobrevivência a 5 anos de 9%,² sendo que, os adenocarcinomas ductais correspondem a cerca de 90% dos tumores deste órgão.⁶ Na maioria dos casos, o PDAC é diagnosticado em estágio avançado, não elegível para tratamento cirúrgico.² Atualmente, as terapêuticas aprovadas para o PDAC não ressecável, que incluem quimioterapia com gemcitabina, *gemcitabina/nab-paclitaxel* ou *FOLFIRINOX*, não oferecem prolongamento significativo da sobrevida, evidenciando a necessidade do surgimento de novas estratégias terapêuticas.^{5,14} Nos últimos anos, a aplicação da imunoterapia no tratamento de neoplasias atingiu progressos significativos. A imunoterapia com ICI demonstrou resposta clínica no tratamento de tumores sólidos, sendo que, fármacos como o ipilimumab, pembrolizumab e nivolumab encontram-se aprovados para uso clínico.²⁸ No entanto, a administração de imunoterapia em monoterapia no tratamento do PDAC não revelou sucesso no prolongamento da sobrevida.

O TME do PDAC constitui um obstáculo significativo à eficácia da imunoterapia nesta doença. O TME é formado por células tumorais envolvidas por um estroma fibroso denso,⁸ que, para além de exercer uma barreira física ao atingimento intratumoral de fármacos citotóxicos, imunoterapia e células imunes efetoras, induz também imunossupressão e evasão às defesas do hospedeiro, contribuindo assim para o insucesso da imunoterapia.²⁴ Para além disto, a investigação do TME demonstrou que este desempenha um papel ativo na proliferação, crescimento, invasão e metastização deste cancro.²⁷ Devido à relevância do TME no desenvolvimento do PDAC, o desenvolvimento de terapêuticas específicas que atuem diretamente nos constituintes do TME e que bloqueiem as suas ações, estão a ser ativamente investigadas.

Ensaio pré-clínicos foram realizados com agentes terapêuticos específicos para componentes do TME, como PEGPH20, vismodegib, saridegib, bevacizumab e mogamulizumab. Estes estudos demonstraram resultados promissores com diminuição da progressão tumoral e aumento da sobrevivência. No entanto, aquando da avaliação destas estratégias em ensaios clínicos, não se verificou benefício clínico, pelo que, há necessidade de investigar de forma mais aprofundada a complexidade das interações que ocorrem no TME e os mecanismos compensatórios desencadeados pelo bloqueio das suas ações, de forma a encontrar estratégias de tratamento bem sucedidas que envolvam, em simultâneo, vários constituintes do TME.^{38,43,44}

A investigação dos mecanismos de ação de células como os CAFs, TAMs, Tregs e MDSCs veio demonstrar que estas células modulam o TME ao induzirem imunossupressão e manutenção do estroma desmoplásico.²⁷ Este entendimento motivou o desenvolvimento de estratégias bloqueadoras da ação destas células, sendo que, algumas estratégias promissoras se encontram já a ser testadas em ensaios clínicos. A modulação destas células revelou frequentemente inibição do crescimento do tumor, aumento da infiltração intratumoral de células T efetoras e efeito sinérgico quando associadas a outros regimes de imunoterapia, sugerindo que a terapêutica supressora de células imunossupressoras do TME poderá otimizar o potencial da imunoterapia no PDAC.

Para além de terapêuticas dirigidas ao TME também estão a ser desenvolvidas estratégias que envolvem ICI, ACT e vacinas antitumorais. Os resultados dos ensaios pré-clínicos e clínicos reforçam a noção de que estas terapias têm eficácia reduzida ou até mesmo nula em monoterapia, mas que a combinação de diferentes regimes de imunoterapia ou de regimes de imunoterapia com quimioterapia aumentam a taxa de resposta e poderão atingir benefício clínico.

Concluindo, o PDAC é um tumor altamente quimiorresistente e que não responde a imunoterapia, pelo que, estão a ser desenvolvidos esforços no sentido de ultrapassar as resistências e contornar o mau prognóstico associado a esta doença. Apesar de ainda não ter sido desenvolvido nenhum regime terapêutico com eficácia superior à obtida com o tratamento com quimioterapia, cada ensaio clínico e cada combinação testada aumentam o conhecimento acerca do PDAC e do TME e acerca de potenciais alvos terapêuticos que possam, eventualmente, levar a um tratamento efetivamente eficaz. A reduzida infiltração de células T efetoras, a dominância de células imunossupressoras, a barreira física exercida pelo estroma e a sua heterogeneidade, as interações entre os componentes do TME e os mecanismos adaptativos desencadeados em resposta à terapêutica, são algumas das limitações que terão de ser ultrapassadas no tratamento do PDAC. Assim, a modulação do microambiente tumoral, ao invés da supressão individual dos seus constituintes, através da associação terapêutica, revela-se promissora. Para além disto, a identificação de biomarcadores válidos para a seleção da terapêutica mais apropriada para cada doente,²⁸ poderá melhorar os resultados obtidos. Atualmente, há um vasto número de ensaios clínicos a explorar diferentes combinações terapêuticas de forma a obter sucesso no tratamento desta doença e, finalmente, ser possível prolongar a sobrevivência de pacientes com diagnóstico de PDAC.

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao Professor Doutor Rui Vasco Quintais Gradiz e à Professora Doutora Anabela Mota Pinto todo o apoio, disponibilidade, orientação, dedicação e profissionalismo dispensados ao longo da elaboração deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão, a quem eu devo tudo, estou muito grata pelo incentivo, compreensão e carinho demonstrados não só durante todo o período de realização deste trabalho, mas durante toda a minha vida.

Referências bibliográficas

1. Khalaf N, El-Serag HB, Abrams HR, Thrift AP. Burden of Pancreatic Cancer: From Epidemiology to Practice. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;(June):1-9. doi:10.1016/j.cgh.2020.02.054
2. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol.* 2019;10(1):10-27. doi:10.14740/wjon1166
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
4. Capasso M, Franceschi M, Rodriguez-Castro KI, et al. Epidemiology and risk factors of pancreatic cancer. *Acta Biomed.* 2018;89(2):141-146. doi:10.23750/abm.v89i9-S.7923
5. Ducreux M, Seufferlein T, Van Laethem JL, et al. Systemic treatment of pancreatic cancer revisited. *Semin Oncol.* 2019;46(1):28-38. doi:10.1053/j.seminoncol.2018.12.003
6. Aslan M, Shahbazi R, Ulubayram K, Ozpolat B. Targeted therapies for pancreatic cancer and hurdles ahead. *Anticancer Res.* 2018;38(12):6591-6606. doi:10.21873/anticanres.13026
7. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol.* 2018;24(43):4846-4861. doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846
8. Christenson ES, Jaffee E, Azad NS. Current and emerging therapies for patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: a bright future. *Lancet Oncol.* 2020;21(3):e135-e145. doi:10.1016/S1470-2045(19)30795-8
9. Pokorny AMJ, Chin VT, Nagrial AM, Yip D, Chantrill LA. Metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: diagnosis and treatment with a view to the future. *Intern Med J.* 2018;48(6):637-644. doi:10.1111/imj.13810

10. Suker M, Beumer BR, Sadot E, et al. FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):801-810. doi:10.1016/S1470-2045(16)00172-8
11. Rangarajan K, Pucher PH, Armstrong T, Bateman A, Hamady ZZR. Systemic neoadjuvant chemotherapy in modern pancreatic cancer treatment: A systematic review and meta-analysis. *Ann R Coll Surg Engl.* 2019;101(7):453-462. doi:10.1308/rcsann.2019.0060
12. Flaum N, Hubner RA, Valle JW, Amir E, McNamara MG. Adjuvant chemotherapy and outcomes in patients with nodal and resection margin-negative pancreatic ductal adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Surg Oncol.* 2019;119(7):932-940. doi:10.1002/jso.25440
13. Gupta R, Idoroenyi DO, Vincent A. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer. 2017;(January):1-10. doi:10.1002/jso.24623
14. Springfield C, Jäger D, Büchler MW, et al. Chemotherapy for pancreatic cancer. *Press Medicale.* 2019;48(3P2):e159-e174. doi:10.1016/j.lpm.2019.02.025
15. Vaz-Carneiro A, da Luz R, Borges M, Costa J. Primary and secondary outcomes in oncology clinical trials: Definitions and uses. *Acta Med Port.* 2014;27(4):498-502. doi:10.20344/amp.5286
16. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 2007;25(15):1960-1966. doi:10.1200/JCO.2006.07.9525
17. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 2011;364(19):1817-1825. doi:10.1056/nejmoa1011923
18. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med.* 2013;369(18):1691-1703. doi:10.1056/nejmoa1304369

19. Sok M, Zavrl M, Greif B, Srpčič M. Objective assessment of WHO/ECOG performance status. *Support Care Cancer*. 2019;27(10):3793-3798. doi:10.1007/s00520-018-4597-z
20. Xu J, Wang L, Cheng Y, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: A long and hopeful journey. *Cancer Lett*. Published online 2018. doi:10.1016/j.canlet.2018.03.040
21. Clark CE, Beatty GL, Vonderheide RH. Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: Insights from genetically engineered mouse models of cancer. *Cancer Lett*. 2009;279(1):1-7. doi:10.1016/j.canlet.2008.09.037
22. Torphy RJ, Schulick RD, Zhu Y. Understanding the immune landscape and tumor microenvironment of pancreatic cancer to improve immunotherapy. *Mol Carcinog*. 2020;59(7):775-782. doi:10.1002/mc.23179
23. Wang S, Li Y, Xing C, et al. Tumor microenvironment in chemoresistance, metastasis and immunotherapy of pancreatic cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(7):1937-1953. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32774994><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7407356>
24. Murakami T, Hiroshima Y, Matsuyama R, Homma Y, Hoffman RM, Endo I. Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Ann Gastroenterol Surg*. 2019;3(2):130-137. doi:10.1002/ags3.12225
25. Hosein AN, Brekken RA, Maitra A. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(8):487-505. doi:10.1038/s41575-020-0300-1
26. Melstrom LG, Salazar MD, Diamond DJ. The pancreatic cancer microenvironment: A true double agent. *J Surg Oncol*. 2017;116(1):7-15. doi:10.1002/jso.24643
27. Ren B, Cui M, Yang G, et al. Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1-15. doi:10.1186/s12943-018-0858-1
28. Schizas D, Charalampakis N, Kole C, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: A 2020 update. *Cancer Treat Rev*. 2020;86(January). doi:10.1016/j.ctrv.2020.102016
29. Ho WJ, Jaffee EM, Zheng L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer —

- clinical challenges and opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(9):527-540. doi:10.1038/s41571-020-0363-5
30. Whatcott CJ, Diep CH, Jiang P, et al. Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(15):3561-3568. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1051
 31. Zhang Z, Ji S, Zhang B, et al. Role of angiogenesis in pancreatic cancer biology and therapy. *Biomed Pharmacother*. 2018;108(June):1135-1140. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.136
 32. Erkan M, Kurtoglu M, Kleeff J. The role of hypoxia in pancreatic cancer: A potential therapeutic target? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;10(3):301-316. doi:10.1586/17474124.2016.1117386
 33. Ramanathan RK, McDonough SL, Philip PA, et al. Phase IB/II randomized study of FOLFIRINOX plus pegylated recombinant human hyaluronidase versus FOLFIRINOX alone in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: SWOG S1313. *J Clin Oncol*. 2019;37(13):1062-1069. doi:10.1200/JCO.18.01295
 34. Ebel ND, Zuniga E, Passi KB, Sobocinski LJ, Manuel ER. Hyaluronidase-expressing *Salmonella* effectively targets tumor-associated hyaluronic acid in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(2):706-716. doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0556
 35. Doherty GJ, Tempero M, Corrie PG. HALO-109-301: A Phase III trial of PEGPH20 (with gemcitabine and nab-paclitaxel) in hyaluronic acid-high stage IV pancreatic cancer. *Futur Oncol*. 2018;14(1):13-22. doi:10.2217/fo-2017-0338
 36. Hingorani SR, Harris WP, Beck JT, et al. Phase Ib study of PEGylated recombinant human hyaluronidase and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):2848-2854. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2010
 37. Hingorani SR, Zheng L, Bullock AJ, et al. HALO 202: Randomized phase II Study of PEGPH20 Plus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine Versus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in Patients With Untreated, Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2018;36(4):359-366. doi:10.1200/JCO.2017.74.9564

38. Van Cutsem E, Tempero MA, Sigal D, et al. Randomized phase III trial of pegvorhyaluronidase alfa with nab-paclitaxel plus gemcitabine for patients with hyaluronan-high metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2020;38(27):3185-3194. doi:10.1200/JCO.20.00590
39. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science (80-)*. 2009;324(5933):1457-1461. doi:10.1126/science.1171362
40. De Jesus-Acosta A, Sugar EA, O'Dwyer PJ, et al. Phase 2 study of vismodegib, a hedgehog inhibitor, combined with gemcitabine and nab-paclitaxel in patients with untreated metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2020;122(4):498-505. doi:10.1038/s41416-019-0683-3
41. Catenacci DVT, Junttila MR, Karrison T, et al. Randomized phase Ib/II study of gemcitabine plus placebo or vismodegib, a hedgehog pathway inhibitor, in patients with metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(36):4284-4292. doi:10.1200/JCO.2015.62.8719
42. Van Mackelenbergh MG, Stroes CI, Spijker R, et al. Clinical trials targeting the stroma in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5):1-23. doi:10.3390/cancers11050588
43. Mei L, Du W, Ma WW. Targeting stromal microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: Controversies and promises. *J Gastrointest Oncol*. 2016;7(3):487-494. doi:10.21037/jgo.2016.03.03
44. Lee JJ, Perera RM, Wang H, et al. Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(30). doi:10.1073/pnas.1411679111
45. Costache MI, Ioana M, Iordache S, Ene D, Costache CA Ilexandr., Săftoiu A. VEGF Expression in Pancreatic Cancer and Other Malignancies: A Review of the Literature. *Rom J Intern Med*. 2015;53(3):199-208. doi:10.1515/rjim-2015-0027
46. Kindler HL, Friberg G, Singh DA, et al. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine

- in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):8033-8040. doi:10.1200/JCO.2005.01.9661
47. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: Phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol*. 2010;28(22):3617-3622. doi:10.1200/JCO.2010.28.1386
 48. Lu Z, Weniger M, Jiang K, et al. Therapies Targeting the Tumor Stroma and the VEGF/VEGFR Axis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Target Oncol*. 2018;13(4):447-459. doi:10.1007/s11523-018-0578-x
 49. Han X, Zhang WH, Wang WQ, Yu XJ, Liu L. Cancer-associated fibroblasts in therapeutic resistance of pancreatic cancer: Present situation, predicaments, and perspectives. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2020;1874(2):188444. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188444
 50. Padoan A, Plebani M, Basso D. Inflammation and pancreatic cancer: Focus on metabolism, cytokines, and immunity. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3). doi:10.3390/ijms20030676
 51. Von Ahrens D, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):1-8. doi:10.1186/s13045-017-0448-5
 52. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res*. 2012;10(11):1403-1418. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0307
 53. Norton J, Foster D, Chinta M, Titan A, Longaker M. Pancreatic cancer associated fibroblasts (CAF): Under-explored target for pancreatic cancer treatment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1-18. doi:10.3390/cancers12051347
 54. Gunderson AJ, Yamazaki T, McCarty K, et al. Blockade of fibroblast activation protein in combination with radiation treatment in murine models of pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*. 2019;14(2):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0211117

55. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/COC.0000000000000239
56. Feig C, Jones JO, Kraman M, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(50):20212-20217. doi:10.1073/pnas.1320318110
57. Henze J, Tacke F, Hardt O, Alves F, Rawashdeh W Al. Enhancing the efficacy of car t cells in the tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6). doi:10.3390/cancers12061389
58. Lo A, Wang LCS, Scholler J, et al. Tumor-promoting desmoplasia is disrupted by depleting FAP-expressing stromal cells. *Cancer Res*. 2015;75(14):2800-2810. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3041
59. Melisi D, Garcia-Carbonero R, Macarulla T, et al. Galunisertib plus gemcitabine vs. gemcitabine for first-line treatment of patients with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2018;119(10):1208-1214. doi:10.1038/s41416-018-0246-z
60. Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001
61. Kocher HM, Basu B, Froeling FEM, et al. Phase I clinical trial repurposing all-trans retinoic acid as a stromal targeting agent for pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-18636-w
62. Sherman MH, Yu RT, Engle DD, et al. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell*. 2014;159(1):80-93. doi:10.1016/j.cell.2014.08.007
63. Moo-Young TA, Larson JW, Belt BA, et al. Tumor-derived TGF- β mediates conversion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. *J Immunother*. 2009;32(1):12-21. doi:10.1097/CJI.0b013e318189f13c

64. Li M, Li M, Yang Y, et al. Remodeling tumor immune microenvironment via targeted blockade of PI3K- γ and CSF-1/CSF-1R pathways in tumor associated macrophages for pancreatic cancer therapy. *J Control Release*. 2020;321(17):23-35. doi:10.1016/j.jconrel.2020.02.011
65. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/948098
66. Vonderheide RH. CD40 Agonist Antibodies in Cancer Immunotherapy. *Annu Rev Med*. 2020;71:47-58. doi:10.1146/annurev-med-062518-045435
67. Van Audenaerde JRM, Marcq E, von Scheidt B, et al. Novel combination immunotherapy for pancreatic cancer: potent anti-tumor effects with CD40 agonist and interleukin-15 treatment. *Clin Transl Immunol*. 2020;9(8):1-16. doi:10.1002/cti2.1165
68. Osipov A, Saung MT, Zheng L, Murphy AG. Small molecule immunomodulation: The tumor microenvironment and overcoming immune escape. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1-12. doi:10.1186/s40425-019-0667-0
69. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res*. 2014;74(18):5057-5069. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3723
70. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, et al. PI3K γ 3 is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature*. 2016;539(7629):437-442. doi:10.1038/nature19834
71. Nywening TM, Belt BA, Cullinan DR, et al. Targeting both tumour-associated CXCR2+ neutrophils and CCR2+ macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*. 2018;67(6):1112-1123. doi:10.1136/gutjnl-2017-313738
72. Nywening TM, Wang-Gillam A, Sanford DE, et al. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: A single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(5):651-662.

doi:10.1016/S1470-2045(16)00078-4

73. Pahler JC, Tazzyman S, Erez N, et al. Plasticity in tumor-promoting inflammation: Impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. *Neoplasia*. 2008;10(4):329-339. doi:10.1593/neo.07871
74. Thyagarajan A, Alshehri MSA, Miller KLR, Sherwin CM, Travers JB, Sahu RP. Myeloid-derived suppressor cells and pancreatic cancer: Implications in novel therapeutic approaches. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11). doi:10.3390/cancers11111627
75. Christmas BJ, Rafie CI, Hopkins AC, et al. Entinostat converts immune-resistant breast and pancreatic cancers into checkpoint-responsive tumors by reprogramming tumor-infiltrating MDSCs. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(12):1561-1577. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0070
76. Eriksson E, Wenthe J, Irenaeus S, Loskog A, Ullenhag G. Gemcitabine reduces MDSCs, tregs and TGF β -1 while restoring the teff/treg ratio in patients with pancreatic cancer. *J Transl Med*. 2016;14(1):1-12. doi:10.1186/s12967-016-1037-z
77. Bockorny B, Semenisty V, Macarulla T, et al. BL-8040, a CXCR4 antagonist, in combination with pembrolizumab and chemotherapy for pancreatic cancer: the COMBAT trial. *Nat Med*. 2020;26(6):878-885. doi:10.1038/s41591-020-0880-x
78. Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): A global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387(10018):545-557. doi:10.1016/S0140-6736(15)00986-1
79. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T cells in the tumor microenvironment and cancer progression: Role and therapeutic targeting. *Vaccines*. 2016;4(3):1-25. doi:10.3390/vaccines4030028
80. Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: From bench to bedside. *Int Immunol*. 2015;27(1):11-20. doi:10.1093/intimm/dxu079
81. Zamarin D, Hamid O, Nayak-Kapoor A, et al. Mogamulizumab in combination with durvalumab or tremelimumab in patients with advanced solid tumors: A Phase I Study.

Clin Cancer Res. 2020;26(17):4531-4541. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-0328

82. Torphy RJ, Zhu Y, Schulick RD. Immunotherapy for pancreatic cancer: Barriers and breakthroughs. *Ann Gastroenterol Surg.* 2018;2(4):274-281. doi:10.1002/ags3.12176
83. Kabacaoglu D, Ciecieski KJ, Ruess DA, Algül H. Immune checkpoint inhibition for pancreatic ductal adenocarcinoma: Current limitations and future options. *Front Immunol.* 2018;9(AUG). doi:10.3389/fimmu.2018.01878
84. Kamath SD, Kalyan A, Kircher S, et al. Ipilimumab and Gemcitabine for Advanced Pancreatic Cancer: A Phase Ib Study. *Oncologist.* 2020;25(5):1-8. doi:10.1634/theoncologist.2019-0473
85. Wu AA, Bever KM, Ho WJ, et al. A Phase II Study of Allogeneic GM-CSF–Transfected Pancreatic Tumor Vaccine (GVAX) with Ipilimumab as Maintenance Treatment for Metastatic Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(19):5129-5139. doi:10.1158/1078-0432.ccr-20-1025
86. Nevala-Plagemann C, Hidalgo M, Garrido-Laguna I. From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(2):108-123. doi:10.1038/s41571-019-0281-6
87. Feng M, Xiong G, Cao Z, Yang G, Zheng S. PD-1 / PD-L1 and immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2017;(August):1-9. doi:10.1016/j.canlet.2017.08.006
88. Aglietta M, Barone C, Sawyer MB, et al. A phase I dose escalation trial of tremelimumab (CP-675,206) in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol.* 2014;25(9):1750-1755. doi:10.1093/annonc/mdu205
89. Zhen DB, Coveler A, Zanon S, Reni M, Chiorean EG. Biomarker-driven and molecularly targeted therapies for pancreatic adenocarcinoma. *Semin Oncol.* 2018;45(3):107-115. doi:10.1053/j.seminoncol.2018.05.004
90. Hu Y, Chen W, Yan Z, Ma J, Zhu F, Huo J. Prognostic value of PD-L1 expression in patients with pancreatic cancer. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(3):e14006. doi:10.1097/md.00000000000014006

91. Gao HL, Liu L, Qi ZH, et al. The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in pancreatic cancer: A meta-analysis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2018;17(2):95-100. doi:10.1016/j.hbpd.2018.03.007
92. Overman M, Javle M, Davis RE, et al. Randomized phase II study of the Bruton tyrosine kinase inhibitor acalabrutinib, alone or with pembrolizumab in patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1):1-11. doi:10.1136/jitc-2020-000587
93. Weiss GJ, Waypa J, Coats J, et al. Abstract CT134: Phase I/II trial of gemcitabine, nab-paclitaxel, and pembrolizumab in metastatic pancreatic adenocarcinoma. Published online 2017:CT134-CT134. doi:10.1158/1538-7445.am2017-ct134
94. Lupinacci RM, Bachet JB, André T, Duval A, Svrcek M. Pancreatic ductal adenocarcinoma harboring microsatellite instability / DNA mismatch repair deficiency. Towards personalized medicine. *Surg Oncol*. 2019;28(March 2018):121-127. doi:10.1016/j.suronc.2018.11.019
95. Tsujikawa T, Crocenzi T, Durham JN, et al. Evaluation of Cyclophosphamide/GVAX Pancreas Followed by Listeria-Mesothelin (CRS-207) with or without Nivolumab in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26(14):3578-3588. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3978
96. Anwar MY, Williams GR, Paluri RK. CAR T Cell Therapy in Pancreaticobiliary Cancers: a Focused Review of Clinical Data. *J Gastrointest Cancer*. Published online 2020. doi:10.1007/s12029-020-00457-1
97. Li T, Li H, Li S, et al. Research progress and design optimization of CAR-T therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Med*. 2019;8(11):5223-5231. doi:10.1002/cam4.2430
98. Sahlolbei M, Dehghani M, Kheiri yeghane azar B, et al. Evaluation of targetable biomarkers for chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) in the treatment of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies : Pancreatic cancer is one of the lethal malignant tumours in the world. I. *Int Rev Immunol*. 2020;39(5):223-232. doi:10.1080/08830185.2020.1776274

99. D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L, Alimandi M. CAR-T cells: The long and winding road to solid tumors review-article. *Cell Death Dis.* 2018;9(3). doi:10.1038/s41419-018-0278-6
100. Sahraei M, Roy LD, Curry JM, et al. MUC1 regulates PDGFA expression during pancreatic cancer progression. *Oncogene.* 2012;31(47):4935-4945. doi:10.1038/onc.2011.651
101. Yazdanifar M, Zhou R, Grover P, et al. Overcoming Immunological Resistance Enhances the Efficacy of A Novel Anti-tMUC1-CAR T Cell Treatment against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cells.* 2019;8(9). doi:10.3390/cells8091070
102. Javle M, Golan T, Maitra A. Changing the course of pancreatic cancer - Focus on recent translational advances. *Cancer Treat Rev.* 2016;44:17-25. doi:10.1016/j.ctrv.2016.01.004
103. Matsui H, Hazama S, Shindo Y, Nagano H. Combination treatment of advanced pancreatic cancer using novel vaccine and traditional therapies. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018;18(12):1205-1217. doi:10.1080/14737140.2018.1531707
104. Laheru D, Biedrzycki B, Jaffee EM. Development of a Cytokine-Modified Allogeneic Whole Cell Pancreatic Cancer Vaccine. 980. doi:10.1007/978-1-62703-287-2
105. Laheru D, Lutz E, Burke J, et al. Allogeneic granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor immunotherapy alone or in sequence with cyclophosphamide for metastatic pancreatic cancer: A pilot study of safety, feasibility, and immune activation. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1455-1463. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0371
106. Le DT, Wang-Gillam A, Picozzi V, et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria monocytogenes*-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(12):1325-1333. doi:10.1200/JCO.2014.57.4244
107. Le DT, Picozzi VJ, Ko AH, et al. Results from a phase IIb, randomized, multicenter study of GVAX pancreas and CRS-207 compared with chemotherapy in adults with previously treated metastatic pancreatic adenocarcinoma (ECLIPSE study). *Clin Cancer Res.* 2019;25(18):5493-5502. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2992

108. Soares KC, Rucki AA, Wu AA, et al. PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T-cell infiltration into pancreatic tumors. *J Immunother*. 2015;38(1):1-11. doi:10.1097/CJI.0000000000000062
109. Li K-Y, Yuan J-L, Trafton D, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma immune microenvironment and immunotherapy prospects. *Chronic Dis Transl Med*. 2020;6(1):6-17. doi:10.1016/j.cdtm.2020.01.002