

Maria Pires Terrível

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Oncolytic viruses: what to expect from its use in cancer treatment” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Sandra Colaço Palma, da Dra. Carolina Pinheiro e da Professora Doutora Ana Miguel Matos e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Creative Biolabs. **OncoVirapy™ Platform**. [Acedido a 25 de agosto de 2018] Disponível na internet: <https://www.creative-biolabs.com/car-t/oncovirapy-platform.htm>

Maria Pires Terrível

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Oncolytic viruses: what to expect from its use in cancer treatment” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dr.^a Sandra Colaço Palma, da Dr.^a Carolina Pinheiro e da Professora Doutora Ana Miguel Matos e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Maria Pires Terrível, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013130882, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Oncolytic viruses: what to expect from its use in cancer treatment.” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 28 de agosto de 2018.

Maria Pires Terrível

(Maria Pires Terrível)

Agradecimentos

À minha orientadora Dr.^a Sandra Colaço Palma e a toda a equipa da filial Portuguesa dos Laboratórios Expanscience por me terem recebido tão bem e por tudo o que me ensinaram.

À minha orientadora Dr.^a Carolina Pinheiro, à Dr.^a Mariana Pinho e ao resto da equipa técnica da Farmácia Oudinot pela compreensão e paciência e por todos os conhecimentos que me transmitiram.

À minha orientadora Professora Doutora Ana Miguel Matos por toda a disponibilidade que demonstrou para me ajudar e tranquilizar durante a elaboração da monografia.

Aos meus pais por me apoiarem sempre ao longo deste percurso.

Às minhas avós que fizeram de tudo para que não tivesse de me preocupar com nada para além dos estágios e elaboração dos relatórios e monografia durante este período.

Ao resto da minha família por quererem sempre o melhor para mim.

Ao David por me apoiar e aturar os meus momentos de desespero e dizer sempre que vai correr tudo bem.

Às amigas que Coimbra me deu e que partilharam comigo todos os bons e maus momentos destes 5 anos.

Às amigas de sempre por nunca deixarem de estar presentes apesar da distância que nos mantinha separadas.

A Coimbra e à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por tudo o que lá vivi e aprendi.

Índice

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Agradecimentos	4
Índice	5
Resumo	8
Abstract	8
Abreviaturas.....	9
Introdução	10
Análise SWOT.....	11
<i>Strengths</i> (Pontos Fortes).....	12
<i>Weaknesses</i> (Pontos Fracos)	15
<i>Opportunities</i> (Oportunidades).....	16
<i>Threats</i> (Ameaças).....	17
Conclusão.....	18
Bibliografia	19
Anexos	20

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Resumo	23
Abstract	23
Abreviaturas.....	24
Introdução	25
Análise SWOT.....	26
<i>Strengths</i> (Pontos Fortes).....	27
<i>Weaknesses</i> (Pontos Fracos)	30
<i>Opportunities</i> (Oportunidades).....	32
<i>Threats</i> (Ameaças).....	33
Casos práticos	34
Conclusão.....	35
Bibliografia	36
Anexos	37

Monografia - "Oncolytic viruses: what to expect from its use in cancer treatment"

Resumo	43
Abstract	43
Abbreviations.....	44

Introduction	46
Mechanism of action	47
Immune response	48
Development of oncolytic viruses	49
Strategies to improve selectivity	49
Strategies to improve efficacy.....	50
Safety considerations	52
Clinical applications	53
Combination therapy	65
Oncolytic virotherapy and chemotherapy	65
Oncolytic virotherapy and immune checkpoint inhibitors (ICI).....	65
Oncolytic virotherapy and chimeric antigen receptor (CAR) T cells	66
Oncolytic virotherapy and histone deacetylase inhibitors (HDACi).....	66
Oncolytic virotherapy and bispecific T cell engagers (BiTEs).....	67
Conclusion.....	68
References.....	69

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA



Orientadora: Dr.^a Sandra Colaço Palma

Resumo

O presente relatório tem como objetivo descrever e avaliar o estágio curricular que realizei no departamento de Assuntos Regulamentares dos Laboratórios Expanscience durante 3 meses. São abordadas as atividades desenvolvidas, bem como as dificuldades sentidas e as competências adquiridas, através de uma reflexão sobre os vários pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças (análise SWOT).

Palavras-Chave: relatório de estágio; estágio curricular; laboratórios Expanscience; assuntos regulamentares.

Abstract

The aim of this report is to describe and evaluate the curricular internship I held in the Regulatory Affairs department of Laboratories Expanscience. The report addresses the activities performed, as well as the difficulties experienced and the acquired skills, through a reflection on the various strengths, weaknesses, opportunities and threats (SWOT analysis).

Keywords: internship report; curricular internship; community; laboratories Expanscience; regulatory affairs.

Abreviaturas

AIC – Associação dos Industriais de Cosmética

BAT – “*Bon À Tirer*”

DIM – Delegados de Informação Médica

DM – Dispositivos Médicos

PCHC – Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal

RGPD – Regulamento Geral da Proteção de Dados

SPCC – Sociedade Portuguesa de Ciências Cosmetológicas

Introdução

Os Laboratórios Expanscience, adiante designados por “Expanscience”, são uma empresa francesa fundada em 1950, cuja sede industrial se situa em Epernon, local onde se realizam as atividades de investigação e produção.¹ A Expanscience caracteriza-se como sendo uma empresa de responsabilidade social, que tem como compromisso promover a saúde e bem-estar dos consumidores, ao mesmo tempo que contribui para o desenvolvimento sustentável.² Os principais focos da Expanscience são a saúde da pele e o tratamento da osteoartrite, contando com duas marcas líder: Mustela e Piasclédine 300. A empresa dedica-se ainda ao desenvolvimento e comercialização de ativos de origem natural destinados à indústria cosmética.³

Atualmente, a Expanscience conta com 16 filiais e 90 países distribuidores, sendo que a filial Portuguesa existe desde 1977.¹ Em Portugal apenas são comercializados os produtos Mustela e Noviderm, no entanto esta filial é distribuidora de Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal (PCHC), Medicamentos e Dispositivos Médicos (DM) produzidos por outros laboratórios, nomeadamente pelos laboratórios ASEPTA, Grupo Batteur e Prim. Relativamente à escolha do estágio, inicialmente apenas sabia que pretendia estabelecer contacto com a área de Assuntos Regulamentares, no entanto estagiar na Expanscience permitia aliar isso ao contacto com a indústria cosmética, a qual sempre me despertou interesse.

O presente relatório tem como propósito a apresentação da análise SWOT referente ao estágio que realizei no departamento de Assuntos Regulamentares da filial Portuguesa dos Laboratórios Expanscience, no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), durante um período de 3 meses.

Análise SWOT

<p>S</p> <p>(Strengths)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Condições do estágio• Multidisciplinaridade• Variedade de Produtos• Diversidade de tarefas executadas
<p>W</p> <p>(Weaknesses)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Espaço limitado• Falta de contacto com o fabricante• Pouco contacto com medicamentos• Realização de tarefas por gestão de prioridades
<p>O</p> <p>(Opportunities)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Notoriedade da Marca• Conhecimentos adquiridos• Contacto com entidades regulamentares• Conhecimento de eventos externos à empresa• <i>Soft-skills</i>
<p>T</p> <p>(Threats)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Concorrência• Legislação• Barreira Linguística

Strengths (Pontos Fortes)

1. Condições do estágio

O facto de a filial Portuguesa da Expanscience apenas receber 1 estagiário por período é sem dúvida uma vantagem, uma vez que permite um maior acompanhamento, o qual é fundamental para alguém que não teve contacto prévio com esta área e com as atividades aqui exercidas. O ambiente de trabalho é bastante agradável, todos se mostraram disponíveis para me ensinar e ajudar na realização das tarefas que me foram propostas. A localização é também um ponto forte, uma vez que é central e com grande facilidade de acesso a serviços, nomeadamente transportes e locais de refeição.

2. Multidisciplinaridade

A dinâmica da empresa (Anexo I) permite contactar com várias áreas durante o estágio, as quais passo a enumerar:

Contacto com o Marketing – A maioria do espaço do escritório funciona em *open space*, sendo que o departamento de Assuntos Regulamentares partilha o gabinete com o departamento de *Marketing*, pelo que o contacto entre os dois é frequente. Este aspeto é uma grande mais-valia, uma vez que permite a partilha de ideias e conhecimentos entre ambos os departamentos, fomentando assim o trabalho em equipa. Para além disso, vários materiais desenvolvidos pelo *Marketing* (materiais promocionais, tradução da rotulagem, criação de folhetos, expositores, mupis, etc.) necessitam de ser aprovados pela pessoa responsável dos Assuntos Regulamentares, pelo que esta partilha do espaço facilita essa aprovação. Relativamente ao estágio, foi útil na medida em que pude contactar com o desenvolvimento de diversos materiais promocionais e informativos, o que me permitiu aprofundar conhecimentos relativos principalmente à publicidade de produtos cosméticos, consultando a legislação aplicável à mesma, nomeadamente o Regulamento (UE) n.º 655/2013 da comissão⁴ e o artigo 20º do Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do parlamento europeu e do conselho⁵.

Contacto com a operação logística – Sendo a filial da Expanscience responsável pela distribuição de diversos produtos, a operação logística é fundamental para o correto funcionamento da empresa. Explicaram-me detalhadamente o funcionamento do modelo da cadeia logística (Anexo II), o qual pude verificar na prática ao longo do estágio. Tive ainda oportunidade de acompanhar a minha orientadora numa visita ao operador logístico, neste

caso a Dilofar, e verificar como estavam organizados os produtos e como se procedia a distribuição dos mesmos.

Contacto com a comunidade – É fundamental para o bom funcionamento da empresa estabelecer ligação com os profissionais de saúde e também com os consumidores. Durante o período de estágio, tive oportunidade de acompanhar o dia de trabalho dos Delegados de Informação Médica (DIM), nos quais assisti a formações para consumidoras e enfermeiras e acompanhei ainda na realização da visita médica. Outro aspeto a ter em conta é a disposição dos lineares nas farmácias, devendo esta ser apelativa e organizada. Como tal, é importante o trabalho de *Merchandising*, sendo que o estágio me possibilitou acompanhar *Merchandisers* na visita a algumas farmácias (Anexo III). Tive ainda a possibilidade de colaborar em algumas formações para farmacêuticos, enfermeiras e consumidoras e em outros eventos, como a Reunião Pediátrica da CUF descobertas, onde a MUSTELA esteve presente não só na exposição, mas também na realização de uma apresentação sobre a pele do bebé e da grávida.

3. Variedade de Produtos

Como referi anteriormente, para além dos produtos fabricados pelos Laboratórios Expanscience, a filial Portuguesa distribui produtos fabricados pelos laboratórios ASEPTA, Prim e Grupo Bateau. Este fator permitiu contactar com diversos Produtos Cosméticos, alguns Dispositivos Médicos, um medicamento e um biocida, na realização de tarefas que serão referidas com mais detalhe no ponto seguinte. Esta variedade tornou o estágio bastante enriquecedor, uma vez que a legislação aplicável a cada categoria apresenta diferenças.

4. Diversidade de tarefas executadas

Para realizar as tarefas que me foram propostas durante o estágio, considerei particularmente úteis os conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares “Dermofarmácia e Cosmética” e “Assuntos Regulamentares do Medicamento”. Consequentemente à grande variedade de produtos distribuídos pela Expanscience, existe uma grande diversidade de tarefas que pude executar, das quais se destacam as seguintes:

Avaliação de conformidade dos produtos – A verificação da embalagem e rotulagem dos produtos é uma atividade bastante frequente, de forma a conferir que estas se encontram em conformidade com o que foi aprovado e também com a legislação. Neste âmbito contactei com dois procedimentos: Libertação de “*bon à tirer*” (BAT) e libertação de lotes. O primeiro

realiza-se aquando do lançamento de um novo produto ou quando a rotulagem foi sujeita a alterações, sendo que o objetivo é verificar que a rotulagem do produto recebido está conforme a última versão do BAT aprovada. Para tal, preenche-se um documento denominado “Formulário de verificação e libertação de tradução de BAT”. Relativamente à libertação de lotes, esta é realizada cada vez que o operador logístico, a Dilofar, receciona produtos vindos de França, sendo que este envia para os escritórios da Expanscience um exemplar de cada. É necessário verificar que a rotulagem se encontra em conformidade com o que foi aprovado e também com a legislação, preenchendo o “Formulário de verificação de conformidade do produto”.

Adaptação de materiais ao mercado Nacional – A filial Portuguesa recebe frequentemente materiais elaborados pela casa-mãe, maioritariamente escritos em Francês e Inglês, os quais necessitam de ser traduzidos para se proceder à utilização dos mesmos no mercado Português. Como tal, realizei algumas traduções de rotulagem, conteúdo de sites, folhetos informativos, entre outros materiais.

Reclamações de qualidade, Cosmetovigilância e Vigilância de Dispositivos Médicos – Estes três procedimentos são fundamentais para garantir a segurança dos consumidores e é o departamento de Assuntos Regulamentares o responsável por assegurar a sua correta realização. Considera-se um caso de Cosmetovigilância ou de Vigilância de DM quando ocorre algum efeito adverso possivelmente decorrente do uso de um produto cosmético ou dispositivo médico, respetivamente. Relativamente às Reclamações de Qualidade, estas ocorrem quando o produto aparenta não estar conforme, mas sem ter ocorrido nenhuma reação adversa. Em ambos os casos procede-se à recolha dos dados do reclamante para posterior contacto, o nome e lote do produto e a descrição da situação. É ainda importante recolher o produto e enviar para o fabricante para ser analisado, sendo que nos casos em que ocorrem efeitos adversos esta análise é realizada por uma empresa externa para que a avaliação do produto seja imparcial.

Colaboração em formações e eventos – A Expanscience aposta largamente na formação de profissionais de saúde, estudantes e consumidores. Neste âmbito, colaborei na elaboração de apresentações, nomeadamente na realização de casos práticos relativos à utilização de produtos MUSTELA para serem apresentados a atuais farmacêuticos. Tive ainda oportunidade de colaborar na organização do espaço em diversas formações e eventos e de partilhar a minha

experiência como estagiária numa apresentação realizada no âmbito de uma aula da unidade curricular “Cosmetologia” na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Gestão de informação – Na área de Assuntos Regulamentares é imprescindível que a documentação se encontre devidamente organizada, uma vez que há inúmera informação a registar. Como tal, tive oportunidade de colaborar na preparação de *dossiers* de registo de produtos, com o objetivo de serem comercializados no mercado de Moçambique. Contribuí ainda no preenchimento de um documento relativamente à colocação de biocidas no mercado Português e na elaboração de questões relativas à manipulação de PCHC e DM para fins promocionais, com o objetivo de enviar para a casa-mãe. Grande parte da informação encontra-se em ficheiros Excel, pelo que muitas vezes introduzi e organizei informação nos mesmos, permitindo melhorar o meu domínio desta ferramenta.

Revisão do site MUSTELA – Recentemente, algumas formulações sofreram alterações, pelo que o site se encontrava desatualizado e me foi pedido que procedesse a uma revisão do mesmo.

Reuniões – Tive oportunidade de assistir a várias reuniões, tanto a nível interno como também com entidades externas à empresa, nomeadamente no âmbito do desenvolvimento de uma plataforma e-learning para profissionais de saúde.

Weaknesses (Pontos Fracos)

1. Espaço

Uma vez que o departamento de Assuntos Regulamentares trabalha em *open space* com o *Marketing*, apenas era possível trabalhar nesse espaço quando alguém desses departamentos não estava presente, uma vez que não havia possibilidade de colocar mais uma secretária de trabalho. Como tal, a maior parte do tempo estive noutra gabinete com colaboradores do departamento financeiro, o que por vezes dificultou o acompanhamento de algumas atividades dos Assuntos Regulamentares e da Formação.

2. Falta de contacto com o fabricante

Uma vez que a sede dos Laboratórios Expanscience se situa em França, não houve possibilidade de contactar com as áreas de investigação e produção.

3. Pouco contacto com medicamentos

A Expanscience apenas é responsável pela distribuição de um medicamento, o Champô Parasidose, o qual já se encontra no mercado há algum tempo, pelo que praticamente não contactei com legislação e procedimentos relativos a medicamentos nem presenciei nenhuma situação de Farmacovigilância.

4. Realização de tarefas por gestão de prioridades

Uma vez que o número de colaboradores é um pouco insuficiente para o volume de trabalho, torna-se necessário recorrer a uma gestão de prioridades, o que por vezes leva ao esquecimento de determinadas tarefas que ficam pendentes à medida que vão surgindo outras mais urgentes.

Opportunities (Oportunidades)

1. Notoriedade da Marca

Sendo a MUSTELA uma marca líder em dermocosmética infantil e da grávida e que está presente no mercado há vários anos, foi uma excelente oportunidade adquirir conhecimentos e fazer parte da equipa da Expanscience.

2. Conhecimentos adquiridos

Tendo em conta os produtos que a empresa distribui, tive oportunidade de contactar múltiplas vezes com a legislação aplicável a Produtos Cosméticos e Dispositivos Médicos, o que foi pouco abordado ao longo do curso, pelo que considero que os conhecimentos que adquiri no estágio a esse nível são enriquecedores.

Considero ainda que foi útil para o estágio em Farmácia Comunitária o que aprendi nas várias formações Expanscience a que pude assistir, as quais forneciam informações não só sobre os produtos, mas também sobre as situações em que são recomendados e principalmente sobre as problemáticas da pele do bebé e da grávida.

3. Contacto com entidades regulamentares

Tive oportunidade de estar presente numa reunião com a Presidente da Associação dos Industriais de Cosmética (AIC), a qual foi muito enriquecedora a nível da interpretação de alguns pontos da legislação que suporta a introdução de PCHC no mercado Português.

4. Conhecimento de eventos externos à Expanscience

Tomei conhecimento, a partir de colaboradores da empresa, da ocorrência de eventos relacionados com a área, dos quais tive oportunidade de assistir a uma conferência relativa ao novo Regulamento da Proteção de Dados (RGPD), organizada pela Secção Regional do Sul e Regiões Autónomas da Ordem dos Farmacêuticos e de estar presente no COSMETINNOV 2018 – V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Cosmetológicas (SPCC). No final do estágio foi-me solicitado que realizasse uma apresentação em que resumia aquilo que aprendi no COSMETINNOV, uma vez que mais ninguém da empresa teve oportunidade de estar presente.

5. Soft-Skills

A realização das adaptações de documentos para Português e o contacto com a sede da Expanscience permitiram-me melhorar o domínio da Língua Inglesa e aprender um pouco da Língua Francesa. A integração num novo meio de trabalho é sempre um desafio a nível das relações interpessoais, pelo que o estágio contribuiu também para a minha evolução a esse nível. A capacidade de organização também foi algo que penso ter melhorado ao longo desta experiência.

Threats (Ameaças)

1. Concorrência

O mercado de PCHC é bastante competitivo, sendo que ultimamente várias marcas têm apostado nos produtos para bebé, levando a uma maior indecisão por parte do consumidor no momento da compra. Como tal, torna-se imperativo uma maior aposta nas campanhas de *Marketing*, por forma a competir com a restante oferta disponível no mercado.

2. Legislação

Existe alguma dificuldade na interpretação e aplicação de alguns aspetos da legislação de PCHC e de DM. Uma questão prática com que tive oportunidade de contactar foi o facto de existir alguma falta de informação relativamente à manipulação de DM e PCHC para fins promocionais, nomeadamente o acoplamento de dois produtos com uma etiqueta, a colocação de produtos num *display*, etc., não sendo claro quem pode proceder a essa manipulação e que tipo de autorização necessita de possuir. Ainda relativamente aos PCHC, a utilização de determinados *claims* é também uma questão polémica, no entanto têm vindo a surgir

documentos no sentido de orientar a interpretação do Regulamento (EU) n.º 655/2013⁴ e melhor definir o que é ou não aceitável do ponto de vista regulamentar.

3. Barreira Linguística

A língua Francesa é a mais utilizada na comunicação com a sede e nos materiais que de lá provêm (vídeos, apresentações, etc.). Uma vez que não domino a língua, por vezes era difícil compreender alguma informação.

Conclusão

O campo de atuação do farmacêutico é vasto, pelo que é praticamente impossível contactar com todas as áreas. Porém, penso que a integração deste tipo de estágios no percurso curricular é uma mais-valia, uma vez que possibilita o contacto com realidades menos conhecidas quando comparadas com o exercício da profissão em Farmácia Comunitária, por exemplo. Como tal, considero que a experiência de estagiar nos Laboratórios Expanscience foi muito positiva, o que pode ser verificado pelo elevado número de pontos fortes e oportunidades enumerados, comparativamente aos pontos fracos e ameaças.

Durante o estágio foram úteis os conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares “Assuntos Regulamentares do Medicamento” e “Dermofarmácia e Cosmética”. Contudo, considero que os PCHC e DM poderiam ser abordados com mais detalhe no plano de estudos de MICEF. Na minha opinião, a unidade curricular “Dispositivos Médicos” deveria ser obrigatória, uma vez que são inúmeras as áreas em que o farmacêutico contacta com DM e com a legislação aplicável aos mesmos.

O período de estágio (3 meses) não permite adquirir autonomia na realização de todas as tarefas, no entanto creio que é o suficiente para adquirir noções relativamente ao dia-a-dia de quem trabalha em determinada área, permitindo saber se é algo em que gostaríamos de trabalhar no futuro.

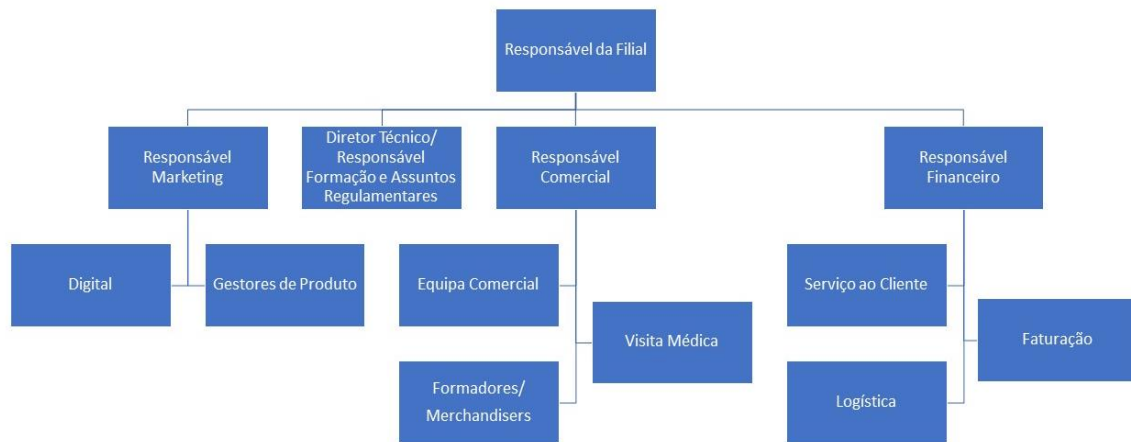
Por fim, este estágio foi sem dúvida enriquecedor a nível curricular e acredito que os conhecimentos adquiridos serão úteis no futuro, no qual espero voltar a ter oportunidade de contactar com a indústria cosmética, nomeadamente nas áreas de Assuntos Regulamentares e *Marketing* Farmacêutico.

Bibliografia

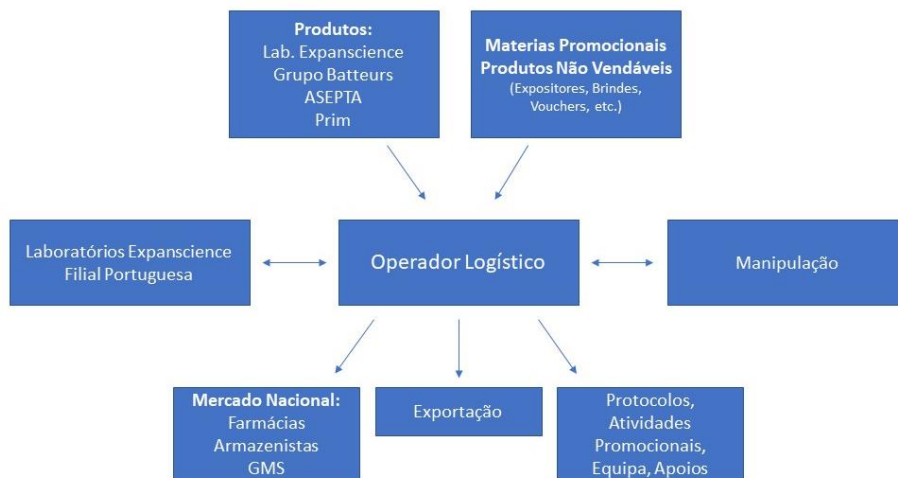
1. EXPANSCIENCE. Página Inicial. [Acedido a 25 de março de 2018] Disponível na internet: <https://www.expanscience.pt/expanscience>
2. EXPANSCIENCE. Compromissos. [Acedido a 25 de março de 2018] Disponível na internet: <https://www.expanscience.pt/compromissos>
3. EXPANSCIENCE. Experiência. [Acedido a 25 de março de 2018] Disponível na internet: <https://www.expanscience.pt/experiencia>
4. Regulamento (UE) 655/2013 de 10 de Julho de 2013, da Comissão. Jornal Oficial da União Europeia. N.º L190. 2013.
5. Regulamento (UE) 1223/2009 de 30 de Novembro de 2009, do Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia. N.º L342. 2009.

Anexos

Anexo I - Organigrama da Filial Portuguesa dos Laboratórios Expanscience.



Anexo II - Modelo da Cadeia Logística da Filial Portuguesa dos Laboratórios Expanscience.



Anexo III - Atividades de merchandising.



RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA



FARMÁCIA OUDINOT

Orientadora: Dr.^a Carolina Pinheiro

Resumo

O presente relatório tem como objetivo descrever e avaliar o estágio curricular em farmácia comunitária que realizei na Farmácia Oudinot durante cerca de 4 meses. São abordadas as atividades desenvolvidas, bem como as dificuldades sentidas e as competências adquiridas, através de uma reflexão sobre os vários pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças (análise SWOT). Para além disso, foram incluídos alguns casos práticos com os quais me deparei durante o estágio.

Palavras-Chave: relatório de estágio; estágio curricular; farmácia comunitária; farmácia oudinot.

Abstract

The aim of this report is to describe and evaluate the curricular internship I held in the community pharmacy “Farmácia Oudinot” for 4 months. The report addresses the activities performed, as well as the difficulties experienced and the acquired skills, through a reflection on the various strengths, weaknesses, opportunities and threats (SWOT analysis). Additionally, it includes some practical cases which I found interesting during the internship.

Keywords: internship report; curricular internship; community pharmacy; pharmacy Oudinot

Abreviaturas

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

PVP – Preço de Venda ao Público

RGPD – Regulamento Geral da Proteção de Dados

Introdução

O presente relatório tem como objetivo a realização de uma análise SWOT relativa ao estágio realizado em Farmácia Comunitária no âmbito da unidade curricular “Estágio Curricular”. Esta unidade curricular é sem dúvida imprescindível, uma vez que a prática é fundamental para consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo destes 5 anos. Optei por realizar este estágio na Farmácia Oudinot, em Aveiro, uma vez que fica situada relativamente perto de onde resido e tinha recebido bom *feedback* de colegas que lá estagiaram anteriormente.

A Farmácia Oudinot foi fundada em 1958 na Rua Engenheiro Oudinot, no entanto em 2016 mudaram de instalações, encontrando-se atualmente no n.º 145 da Avenida Dr. Lourenço Peixinho. As atuais instalações da Farmácia Oudinot são bastante amplas, o que permite ter um elevado número de produtos de saúde acessíveis ao público, como por exemplo produtos pertencentes às secções de puericultura, higiene oral, dermocosmética, nutrição e dietética, primeiros socorros e dispositivos médicos. Atrás dos balcões de atendimento situam-se alguns Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e Suplementos Alimentares. Ainda na zona acessível ao público, a farmácia dispõe de dois gabinetes de atendimento para a prestação de serviços de saúde, nomeadamente medição da pressão arterial, glicémia, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, ácido úrico e hemoglobina. Procede-se ainda à administração de algumas vacinas e medicamentos injetáveis nestes gabinetes. Relativamente ao *back-office*, este é constituído pelo gabinete de direção técnica, laboratório, armazém e zona de receção de encomendas.

Para além da Direção Técnica, que pertence à Dr.^a Mariana Lopes Pinho, a equipa da Farmácia Oudinot é constituída por cinco farmacêuticos, dois técnicos de farmácia e uma auxiliar.

Análise SWOT

<p style="text-align: center;">S (Strengths)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Integração• Organização interna• Plano de estágio• Realização de tarefas no <i>back-office</i>• Prestação de Serviços Farmacêuticos• Preparação de Medicamentos Manipulados e reconstituição de Preparações Extemporâneas• Contacto com o receituário• Dispensa de medicamentos para instituições de ação social• Atendimento ao público e Aconselhamento Farmacêutico
<p style="text-align: center;">W (Weaknesses)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Escasso conhecimento de nomes comerciais• Escasso conhecimento das posologias• Dificuldade na interpretação de Receitas Manuais• Formação insuficiente em Produtos de Saúde• Formação insuficiente em Medicamentos Veterinários• Insegurança no atendimento
<p style="text-align: center;">O (Opportunities)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Participação em iniciativas de promoção para a saúde• Formações externas e internas
<p style="text-align: center;">T (Threats)</p>	<ul style="list-style-type: none">• Medicamentos Esgotados• Novo Regulamento Geral da Proteção de Dados• Locais de Venda de MNSRM• Incompreensão dos utentes perante restrições na dispensa de MSRM

Strengths (Pontos Fortes)

1. Integração

Considero que a integração foi excelente, sendo que todos os colaboradores se mostraram sempre disponíveis para me ensinar e ajudar naquilo que precisasse. É de salientar que todos os elementos da equipa possuem um elevado sentido de responsabilidade social como profissionais de saúde, o que considerei particularmente motivador para o desempenho das minhas funções corretamente.

2. Organização Interna

Um dos aspetos que considerei bastante positivo foi a dinâmica interna da equipa da Farmácia Oudinot. Diferentes tarefas como por exemplo a leitura de e-mails, realização de encomendas, preparação de manipulados, controlo da temperatura e humidade, fornecimento de medicação a instituições de ação social, entre outras, estão delegadas por forma a que cada um tenha as suas responsabilidades, no entanto todos têm conhecimentos para realizar as diversas atividades na ausência do seu responsável. Para além disso, estavam estabelecidos procedimentos claros que descreviam como realizar determinada tarefa, alguns estavam inclusive colocados na parede na zona de receção de encomendas ou no laboratório, o que facilitava a sua consulta quando necessário.

3. Plano de Estágio

O estágio decorreu de forma sequencial e organizada, começando por um período em que apenas realizava tarefas no *back-office*, passando para a prestação de alguns serviços farmacêuticos e por fim para o atendimento ao público. Foi-me possível realizar as mais diversas atividades do dia-a-dia de um colaborador de Farmácia Comunitária, as quais serão abordadas individualmente ainda nesta secção, uma vez que todas constituem pontos fortes para a minha aprendizagem durante o estágio.

4. Realização de tarefas no *back-office*

Num período inicial apenas contactava com as atividades do *back-office*, nomeadamente a receção de encomendas e organização dos medicamentos. Este período de adaptação foi fundamental para me familiarizar com alguns nomes comerciais e indicações terapêuticas, bem como para saber onde se localizavam os diversos produtos na farmácia. Considero ainda que foi útil para aprender a utilizar o Sifarma 2000[®], sistema utilizado pela Farmácia Oudinot nas atividades diárias da farmácia.

No âmbito do trabalho realizado no *back-office*, considero que foi útil a unidade curricular “Organização e Gestão Farmacêutica”, a qual me permitiu compreender a forma como os produtos se encontram dispostos, não só no armazém como também na zona acessível ao público. Cada produto tem uma localização definida e todos devem ser arrumados de acordo com a regra “*first-expire, first-out*”, isto é, aqueles que têm o prazo de validade mais curto devem ficar mais acessíveis para que sejam vendidos primeiro. Para além disso, todos os meses é emitida uma listagem com os produtos cuja validade expira nos três meses seguintes, sendo que esses são segregados e posteriormente devolvidos ao fornecedor.

Embora a receção de encomendas e organização de medicamentos constituam grande parte do trabalho realizado no *back-office*, este abrange outras tarefas, como por exemplo reportar reclamações ou inconformidades aos fornecedores, bem como a realização de devoluções e regularização das mesmas por nota de crédito ou por outros produtos.

5. Prestação de Serviços Farmacêuticos

De acordo com o Decreto-Lei 307/2007¹, de 31 de Agosto, “As farmácias podem prestar serviços de promoção da saúde e do bem-estar dos utentes”. Praticamente desde o início do estágio tive oportunidade de prestar serviços farmacêuticos como medição da pressão arterial e de alguns parâmetros bioquímicos, nomeadamente glicémia, colesterol total, colesterol HDL e triglicéridos. Previamente a realizar estes testes nos utentes, tive a oportunidade de treinar com outra estagiária, praticando as medições uma na outra.

O setor farmacêutico recentemente teve de se adaptar às novas necessidades dos consumidores e uma das formas de o fazer é através da prestação de serviços outrora não convencionais, nomeadamente consultas de nutrição, que no caso da Farmácia Oudinot ocorriam todas as segundas-feiras e podiam ser frequentadas por qualquer utente mediante marcação prévia.

6. Preparação de Medicamentos Manipulados e reconstituição de Preparações Extemporâneas

A Farmácia Oudinot prepara alguns manipulados mais comuns, sendo que assisti à preparação de um xarope de trimetropim, de um álcool boricado, de uma solução de minoxidil em combinação com um shampoo existente no mercado (iiox), entre outros. Numa fase final do estágio, tive oportunidade de realizar eu própria dois manipulados, sob supervisão de uma farmacêutica, nomeadamente uma vaselina salicilada a 2% e uma pomada de enxofre a 6%.

A realização dos manipulados é feita de acordo com a Portaria n.º 594/2004², de 2 de Junho, que aprova as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar. A farmácia dispõe de exemplares da Farmacopeia Portuguesa e do Formulário Galénico Português para consulta previamente à preparação de um medicamento manipulado. Possui também impressas as fichas de preparação dos manipulados (Anexo I) anteriormente preparados e ainda a portaria acima referida, bem como a Portaria n.º 769/2004³, de 1 de Julho, que estabelece como deve ser calculado o preço de venda ao público dos medicamentos manipulados por parte das farmácias. No sentido de agilizar o processo de preparação de medicamentos manipulados e respetivo registo, existem arquivados no computador da farmácia modelos das fichas dos manipulados mais frequentemente preparados e folhas de cálculo para determinar o respetivo preço de venda ao público (PVP), de forma a serem facilmente alterados de acordo com o manipulado que se estava a preparar sem ser necessário criar um ficheiro de raiz. Outro passo fundamental aquando da preparação de medicamentos manipulados é a elaboração do rótulo, o qual deve ser devidamente alocado à embalagem do medicamento e deve também constar na ficha de preparação do manipulado. É de notar que os conhecimentos adquiridos na unidade curricular “Farmácia Galénica” foram cruciais para melhor compreender a preparação dos medicamentos manipulados e a burocracia inerente.

Para além da preparação de medicamentos manipulados, o laboratório era frequentemente utilizado para a reconstituição de preparações extemporâneas.

Tanto para os medicamentos manipulados como para as preparações reconstituídas, aquando da dispensa, alertava o doente para o prazo de validade, forma de conservação, posologia e, quando aplicável, para agitar antes de utilizar.

7. Contacto com o receituário

Ainda antes de iniciar o atendimento ao público, pude assistir ao fecho do mês, altura em que todas as receitas são devidamente separadas para enviar para os respetivos organismos de comparticipação. Este aspeto foi útil para contactar com receitas manuais e também com os regimes de comparticipação mais comuns.

8. Dispensa de medicamentos para instituições de ação social

Uma instituição de ação social envia semanalmente para a Farmácia Oudinot as receitas com a medicação que necessitam. Desde o início do estágio tive oportunidade de fazer a

dispensa desta medicação, o que se revelou bastante útil para contactar com várias receitas eletrónicas previamente a iniciar o atendimento ao público.

9. Atendimento ao público e Aconselhamento Farmacêutico

Este foi sem dúvida o ponto mais desafiante do estágio em Farmácia Comunitária, não só pela necessidade de estabelecer uma boa comunicação com os utentes, mas principalmente pelos conhecimentos que são necessários para realizar um bom aconselhamento, tanto na dispensa de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) mediante prescrição, como na venda de MNSRM e outros produtos de saúde.

Um aspeto importante prende-se com a realização das perguntas certas ao utente, as quais por vezes parecem óbvias, mas com o nervosismo dos primeiros atendimentos facilmente são esquecidas. Esta é uma situação que não deve acontecer, pelo que os outros colaboradores procuravam ajudar-me nesse aspeto. Aquando da dispensa de uma prescrição médica, questionava sempre o utente se a medicação era para si e se era a primeira vez que ia utilizar. Ainda que não fosse medicação nova para o utente, procurava confirmar que este a tomava de forma correta, principalmente no caso de utentes polimedicados. No caso da indicação farmacêutica de MNSRM e Suplementos Alimentares questionava o utente se estava a tomar alguma medicação e tentava também perceber exatamente quais os sintomas que pretendia tratar.

No âmbito do atendimento ao público pude aplicar conhecimentos de várias unidades curriculares, nomeadamente “Farmacologia I”, “Farmacologia II”, “Farmacoterapia” e “Intervenção Farmacêutica em Auto-cuidados de Saúde e Fitoterapia”. Também a unidade curricular “Deontologia e Legislação Farmacêutica” me transmitiu noções importantes para o exercício das funções do farmacêutico no atendimento.

Weaknesses (Pontos Fracos)

I. Escasso conhecimento de nomes comerciais

Embora no período passado no *back-office* tenha contactado com inúmeros medicamentos e respetivos nomes comerciais, uma das maiores dificuldades que senti no atendimento ao balcão foi associar determinado nome comercial à respetiva substância ativa e indicação terapêutica. Enquanto que na dispensa de MSRM mediante prescrição eletrónica o processo ficava facilitado uma vez que o próprio sistema continha toda a informação necessária, no caso das prescrições manuais ou quando me solicitavam MNSRM e outros Produtos de Saúde,

muitas vezes não compreendia o nome por não estar familiarizada com ele. Esta questão melhorou com a prática e durante o estágio também consegui tornar mais ágil a pesquisa quando não sabia de que medicamento se tratava ou qual a sua indicação terapêutica.

2. Escasso conhecimento das posologias

Outro desafio com que frequentemente me deparei prende-se com as posologias tanto dos MSRM como dos MNSRM. Mais uma vez, no caso das receitas eletrónicas temos acesso à informação das posologias indicada pelo médico, quer seja na guia de tratamento, no caso das receitas eletrónicas materializadas, ou no próprio sistema após a introdução dos códigos no caso das desmaterializadas. Aquando a dispensa das receitas manuais muitas vezes não compreendia a posologia indicada, pelo que tinha de consultar outros colaboradores para me certificar que transmitia a informação correta ao utente. Em situações de dispensa de MNSRM por indicação farmacêutica, muitas vezes tinha de consultar a embalagem ou o folheto informativo no sentido de saber qual a posologia que deveria ser seguida.

3. Dificuldade na interpretação de receitas manuais

As receitas manuais constituíram também uma dificuldade, uma vez que, como já referi anteriormente, nem sempre compreendia o nome dos medicamentos, bem como a posologia indicada. Para além disso, é necessário estar com bastante atenção ao conferir todos os elementos a confirmar, nomeadamente a vinheta do prescritor, respetiva assinatura, identificação da exceção, validade da prescrição e número de embalagens prescritas.⁴ Ao início sentia bastante insegurança na dispensa destas receitas, no entanto foi algo que melhorou ao longo do estágio, embora continuasse por vezes a preferir confirmar com algum colega se estava a realizar a dispensa corretamente.

4. Formação insuficiente em Produtos de Saúde

O setor farmacêutico tem vindo a adaptar-se às novas necessidades dos consumidores, nomeadamente através do aumento da oferta de Produtos de Saúde. Senti dificuldade em algumas categorias destes produtos, principalmente na Puericultura, a qual considero que não está devidamente abordada no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e são produtos cada vez mais procurados nas farmácias, uma vez que estas transmitem uma certa confiança aos utentes devido ao aconselhamento prestado, o que não ocorre num supermercado nem mesmo numa parafarmácia.

5. Formação insuficiente em Medicamentos Veterinários

Durante o estágio senti bastante insegurança aquando do aconselhamento de Medicamentos Veterinários, sobre os quais as pessoas fazem frequentemente várias questões. Ainda que seja transmitida alguma informação relativa a esta categoria de medicamentos na unidade curricular “Preparações de Uso Veterinário”, considero que apenas uma unidade curricular não é suficiente para consolidar estes conhecimentos, uma vez que a oferta de produtos é cada vez maior. Ao longo do período de estágio procurei aprender mais com os outros colaboradores da farmácia sobre este tema, por forma a ser capaz de aconselhar devidamente estes produtos sem necessitar de ajuda.

6. Insegurança no atendimento

Devido às lacunas de conhecimento supramencionadas, por vezes não apresentava a confiança necessária durante determinados atendimentos, o que levava a alguma descredibilização por parte do utente. No entanto, também este aspeto foi sendo mitigado no decorrer do estágio à medida que ia praticando.

Opportunities (Oportunidades)

I. Participação em iniciativas de promoção para a saúde

A Farmácia Oudinot adere frequentemente a iniciativas de promoção para a saúde, sendo que eu e outra colega estagiária tivemos oportunidade de participar em três atividades. Logo na primeira semana de estágio fomos convidadas a participar num rastreio que se realizou fora da farmácia e no qual medimos a Pressão Arterial, a Glicémia e também o Índice de Massa Corporal. Seguiu-se um rastreio semelhante, mas desta vez no interior da farmácia e para o qual nos foi pedido que elaborássemos um folheto (Anexo III) para publicitar a atividade. Por fim, representámos a farmácia numa Feira da Saúde numa escola na zona de Aveiro, evento para o qual também elaborámos diversos folhetos (Anexo IV), desta vez de carácter informativo.

2. Formações Externas e Internas

Foram vários os momentos de formação ao longo do estágio, tanto em situações em que os delegados se dirigiam à farmácia para apresentar novos produtos, como quando nos dirigíamos a formações específicas de determinado laboratório. Estas formações foram bastante úteis, uma vez que muitas foram direcionadas para Produtos de Saúde e MNSRM, nomeadamente Medicamentos Veterinários, o que permitiu colmatar em parte a lacuna de

conhecimentos nestas áreas. Outra forma de assistir a formações é através de plataformas online, sendo que realizei por esse meio uma formação sobre a aplicação do Regulamento Geral da Proteção de Dados (RGPD)⁵, um tema que está bastante em voga neste momento.

Threats (Ameaças)

1. Medicamentos esgotados

Esta é uma realidade que não tinha noção antes de iniciar o estágio em Farmácia Comunitária. Foram várias as situações que presenciei de produtos que estavam esgotados a nível dos laboratórios fabricantes e consequentemente dos fornecedores. Enquanto que por vezes existiam substitutos desses medicamentos, noutras não e notava-se uma certa falta de compreensão por parte dos utentes relativamente ao farmacêutico não conseguir solucionar a questão.

2. Novo Regulamento Geral da Proteção de Dados (RGPD)

Embora o objetivo deste regulamento seja a proteção dos dados dos consumidores⁵, veio causar alguma agitação no setor, uma vez que as farmácias lidam com vários dados pessoais. Situações como consultar o histórico de compras do utente no sentido de saber qual o medicamento habitual quando ele não se recorda, com o intuito apenas de melhorar o atendimento e satisfazer o utente, podem ficar comprometidas com a aplicação do novo regulamento.

3. Locais de Venda de MNSRM

Com a abertura de várias parafarmácias e outros locais de venda de MNSRM, as farmácias tiveram de se adaptar, nomeadamente aumentando a oferta em diversos Produtos de Saúde. Vejamos o caso particular da Wells, esta cadeia tem um enorme poder de compra pelo que tende a praticar preços mais baixos, sendo que as farmácias têm de competir com esses preços, reduzindo as suas margens, para não perder os clientes.

4. Incompreensão dos utentes perante restrições na dispensa de MSRM

São inúmeras as vezes que um utente se dirige à farmácia para solicitar algo sujeito a receita médica, principalmente quando são situações recorrentes, como é o caso da utilização de antibióticos nas infeções urinárias ou de anti-inflamatórios como o Brufen[®] 600 ou o Nimed[®] que alegam já ter tomado anteriormente para determinada situação. Nota-se uma grande incompreensão por parte dos utentes quando é negada a dispensa, sendo que é

necessário todos trabalharmos no sentido de alertar as pessoas para o uso racional do medicamento e procurar solucionar as questões com MNSRM ou quando necessário explicar pacientemente aos utentes a necessidade de consultarem um médico.

Casos práticos

Caso II

Senhor com cerca de 40 anos que se queixava de diarreia e dor de estômago e pediu Imodium Rapid®. Questionei se tinha febre, ao que ele respondeu que tinha tido no dia anterior. Expliquei que os sintomas eram compatíveis com uma gastroenterite e que nesses casos não é desejável parar a diarreia, uma vez que esta atua como um mecanismo de desintoxicação do organismo. Referi a importância de medidas não farmacológicas como beber água ou outros líquidos para se manter hidratado. Sugeri o Dioralyte® com o objetivo de repor água e eletrólitos que são eliminados em grande quantidade nos episódios diarreicos. Aconselhei ainda a toma de UL-250® cápsulas, que contém *Saccharomyces boulardii*, um probiótico que vai ajudar a restabelecer a função intestinal⁶. Indiquei também um inibidor da bomba de prótons, neste caso o Proton®, com o objetivo de diminuir o desconforto a nível do estômago. Por fim, alertei que deveria consultar um médico no caso de não haver melhoria dos sintomas em cerca de 3 dias.

Caso III

Mulher que se dirigiu à farmácia com a filha de 4 anos com varicela, referindo que foi ao médico e que lhe foi prescrito Ben-U-Ron® xarope para o caso de ter febre e também Aerius® xarope para aliviar o prurido. Embora já estivesse a utilizar o Aerius®, a menina continuava com bastante prurido e a mãe procurava algo principalmente para aliviar este sintoma. Referi que o prurido podia ser aliviado com recurso a banhos de água morna e recomendei a aplicação de Pruriced Gel® que contém calamina, a qual possui uma ação calmante. Sugeri ainda o Cytelium® *spray*, com o objetivo de secar as lesões e assim facilitar a sua cicatrização.

Caso IV

Mulher com cerca de 40 anos que se dirigiu à farmácia com prescrição de Amoxicilina + Ácido Clavulânico 875/125 e em conversa referiu que no seu caso a toma de antibióticos tende a ter como consequência o aparecimento de candidíase vaginal. Perante esta afirmação, sugeri-lhe que experimentasse utilizar como prevenção o Woman ISDIN Isadin Plus®, cápsulas moles vaginais que contêm na sua composição probióticos, neste caso *Lactobacillus plantarum*, com o objetivo de restaurar o equilíbrio da flora vaginal e normalizar o pH, devolvendo a sua

capacidade de proteção. Para além disso, as cápsulas têm uma ação hidratante, calmante e lubrificante, aliviando o prurido. A embalagem traz 10 cápsulas vaginais e expliquei que devia utilizar uma cápsula por dia durante 6 dias e depois 1 cápsula por semana durante 4 semanas, devendo a cápsula ser aplicada sempre ao deitar. Alertei ainda para o facto de que as cápsulas devem ser conservadas no frigorífico para que mantenham as suas propriedades⁷.

Conclusão

O farmacêutico atua como elo de ligação entre o medicamento e o doente, desempenhando um papel fundamental no sentido de assegurar a correta utilização da terapêutica, por forma a garantir a segurança e eficácia da mesma.

É de salientar que o consumidor de hoje em dia é cada vez mais exigente devido à vasta informação que se pode encontrar nos diferentes meios de comunicação, pelo que temos de estar preparados para responder às mais diversas questões sobre os medicamentos e outros produtos de saúde e não devemos inibir-nos de pesquisar quando não sabemos.

A frequência do estágio foi de cerca de 4 meses, tempo esse que considero ter sido suficiente para consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos de estudos contemplados no plano de MICF. No entanto, são inúmeros os medicamentos e produtos de saúde disponíveis, pelo que seria necessário bastante mais tempo para me sentir verdadeiramente autónoma. Desta forma, é imprescindível que a busca pelos novos conhecimentos não termine por aqui, devendo a aprendizagem ser um processo contínuo ao longo da vida profissional, sendo que nos cabe a nós, como futuros farmacêuticos, prestigiar o bom nome da profissão através da prestação de serviços de excelência.

Bibliografia

1. Decreto-Lei 307/2007, de 31 de Agosto. Diário da República n.º 168/2007, Série I. 6083-6091.
2. Portaria N.º 594/2004 de 2 de junho. Diário da República n.º 129/2004, Série I-B. 3441-3445.
3. Portaria N.º 769/2004 de 2 de junho. Diário da República n.º 153/2004, Série I-B. 4016-4017.
4. PORTUGAL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Normas Relativas à Prescrição de Medicamentos e Produtos de Saúde. Lisboa: Ministério da Saúde [Acedido a 18 de agosto de 2018] Disponível na internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Dispenza/4c1aea02-a266-4176-b3ee-a2983bdf790
5. Regulamento (UE) 2016/679 de 27 de abril de 2016, do Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia. N.º L119. 2016.
6. INFARMED. Resumo das Características do Medicamento UL-250, 250 mg, cápsulas. Lisboa: INFARMED, IP. [Acedido a 18 de agosto de 2018] Disponível na internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8813&tipo_doc=rcm
7. ISDIN. Isadin Plus. [Acedido a 18 de agosto de 2018] Disponível na internet: <https://www.isdin.com/pt-PT/produto/woman-isdin/isadin-plus>

Anexos

Anexo I - Exemplo de uma ficha de preparação de manipulados.

Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados

Vaselina Salicilada 2%

Forma Farmacêutica: Pomada propriamente dita

Data de Preparação: 18 de Julho de 2018

Nº Lote: 14/18 Quantidade a preparar: 50g

Matérias-Primas	Lote nº	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100 g (ml)	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica Operador e data	Rubrica Supervisor e data
Ácido salicílico	150346	Acofarma	FP 9	2g	1 g	1 g	18.07.2018	18.07.2018
Vaselina sólida	1802025	Acofarma	FP 9	qbp 100g	49 g	49 g	18.07.2018	18.07.2018

Fontes bibliográficas: FGP 2001 e FP 9

Operador: MA Data: 18.07.2018

Diretor Técnico: _____ Data: 18.07.2018

Preparação

1. Limpar a placa de espatulação com álcool a 70.	MA
2. Pesar as matérias primas.	MA
3. Pulverizar o ácido salicílico.	MA
4. Incorporar aos poucos, por espatulação, o ácido salicílico na vaselina sólida.	MA
5. Espatular até obtenção de uma pomada com aspecto homogêneo.	MA
6. Lavar a placa de espatulação e os restantes utensílios utilizados.	MA
7. Secar o material.	MA
8. Proceder ao controlo de qualidade.	MA
9. Embalar e rotular.	MA
10.	
11.	
12.	
13.	
14.	
15.	

Operador: MA Data: 18.07.2018

Diretor Técnico: _____ Data: 18.07.2018

Aparelhagem usada: Balança Analítica

Embalagem

Tipo de Embalagem: Bolião de plástico

Capacidade do recipiente: 50 g

Material de Embalagem	Nº Lote	Origem
Bolião de plástico		Aponorm

Condições de Conservação: Embalagem estanque e opaca, ao abrigo da luz e em local seco e fresco.

Prazo de Utilização: 60 dias

Rotulagem

- Proceder à elaboração do rótulo de acordo com o modelo descrito em seguida.
- Anexar a esta ficha de preparação uma cópia, rubricada e datada, do rótulo da embalagem dispensada.

Farmácia Oudinot – Rua Eng. Oudinot, 28 3800-172 Aveiro Telefone: 234 423 644
Dir. Téc.: Dra. Mariana Lopes Pinho Médico Prescritor:
Utente:

Pomada de Ácido salicílico

Quantidade dispensada: 50g
Uso externo
Data de Preparação: 18.07.2018
Prazo de utilização: 60 dias
Condições de Armazenamento: Frasco bem fechado, temperatura ambiente.
Nº lote: 14/18
Manter fora do alcance das crianças.

Operador: MA Data: 18.07.2018

Diretor Técnico: _____ Data: 18.07.2018

Verificação

Ensaio	Especificações	Resultado	Operador
aspecto	homogénea	conforme	MA
cor	branca	conforme	MA
odor	característico a vaselina	conforme	MA
quantidade	50 g +/- 5%	conforme	MA

Aprovado X Rejeitado

Operador: MA

Supervisor: [Assinatura]

Dados de identificação

Nome do utente: _____

Médico Prescritor: _____

Anotações:

Operador: MA Data: 18.07.2018

Diretor Técnico: _____ Data: 18.07.2018

Anexo II - Inaladores utilizados para demonstração.



Anexo III - Folheto elaborado para rastreio na Farmácia Oudinot.



Sabia que..

Em Portugal existem dois milhões de hipertensos, dos quais apenas:

- 50% sabe que sofre desta patologia
- 25% é medicado
- 11% tem a tensão efetivamente controlada



A hipertensão arterial ocorre quando o sangue exerce uma força excessiva sobre as artérias de forma continuada ao longo do tempo.

Quais os fatores de risco?

- Tabagismo
- Diabetes
- Excesso de peso
- Dislipidémia
- Antecedentes familiares
- Stress

Quais as consequências a longo prazo?

- Doença cardíaca
- AVC
- Insuficiência Renal
- Glaucoma

*Evolui sem sintomas, mas com riscos...
...por isso o ideal é prevenir*

Quais as medidas de prevenção?

- Alimentação saudável (maior consumo de legumes e frutas e menor ingestão de gorduras e sal)



- Moderação do consumo de álcool e café



-Atividade física regular



- Com a ajuda da sua farmácia, vigiar com regularidade diversos fatores de risco (medir a tensão, glicémia, colesterol...)

Quais os cuidados a ter com a medicação?

- Cumprir as doses e horários indicados pelo médico
- Não iniciar nem interromper a terapêutica por iniciativa própria (Estes medicamentos não curam a hipertensão arterial, pelo que se deixar de os tomar os valores sobem novamente)
- Existem alguns medicamentos e produtos naturais que podem alterar os valores da pressão arterial, pelo que aquando da aquisição destes produtos deve informar o profissional de saúde que é hipertenso.



Anexo IV - Folhetos elaborados no âmbito da feira da saúde.

SOCORRO, TENHO ACNE!



FARMÁCIA OUDINOT

Avenida Dr. Lourenço Peixinho 145,
Aveiro.
Tel: 234423644

Sabias que...

A acne afeta 85 a 100% da população em algum momento da sua vida



Com a acne surgem pontos negros ou "borbulhas", muitas vezes logo no rosto! Importa tratar o mais cedo possível para não ficarem marcas e para te sentires bem contigo próprio!



O aparecimento de **acne** na adolescência:



Formas de manifestação da acne:

- Comedões abertos (pontos brancos)
- Comedões fechados (pontos negros)
- Pápulas (saliências vermelhas)
- Pústulas (espinhas)
- Nódulos (saliências maiores, sólidas e dolorosas)
- Lesões quísticas (nódulos de conteúdo purulento)

Para além do rosto, pode haver outras zonas afetadas...



Quais os cuidados a ter?

De manhã e à noite em todo o rosto

- Limpar e tonificar a pele com produtos para pele oleosa/acneica (água micelar, gel, espuma).

- Hidratar, regular a produção de gordura e acalmar a pele com produtos oil free.

Na zona a tratar

- Aplicar um produto com ação purificante e que reduza a proliferação bacteriana.

- Disfarçar as lesões (existem lápis e sticks corretores, bem como cremes com cor)

Consultar um dermatologista

- Pode ser necessário um tratamento mais específico, com recurso a medicamentos.



Proibido espremer!

Espremer as borbulhas pode deixar marcas no rosto, que demoram ainda mais a desaparecer.



O sol engana!

O bronzeador disfarça a acne, mas seca a pele levando a que seja produzida ainda mais gordura. Todos os dias de manhã deves aplicar protetor solar! Existem protetores oil free, com formulações adequadas para pele oleosa.

QUAL O MEU TIPO DE PELE?



FARMÁCIA OUDINOT
Avenida Dr. Lourenço Peixinho 145,
Aveiro.



- ❖ Baça e áspera
- ❖ Por vezes com descamação e/ou vermelhidão
- ❖ Sensação de repuxar após o banho
- ❖ Poros não visíveis

Sugestão de Ritual

Água Micelar
OU
Leite de Limpeza + Tónico



Creme Hidratante/Nutritivo Textura Rica

+

Máscara Hidratante (1 a 2x por semana)



- ❖ Brilho saudável e toque aveludado
- ❖ Poros pouco visíveis



- ❖ Oleosidade e brilho mais concentrados na zona T (testa, nariz e queixo) e restantes zonas secas ou com pele normal
- ❖ Poros dilatados na zona T
- ❖ Acne ocasional



Sugestão de Ritual

Água Micelar
OU
Espuma de Limpeza

+

Creme Hidratante

+

Esfoliante (1 a 2x por semana)



- ❖ Excesso de oleosidade e brilho em todo o rosto
- ❖ Poros dilatados
- ❖ Tendência acneica

Sugestão de Ritual

Água Micelar
OU
Gel de Limpeza

+

Creme Hidratante Textura Fluída
OU

+

Creme Matificante

+

Cuidados específicos para pele acneica
(no caso de existir acne)

+

Esfoliante (1 a 2x por semana)

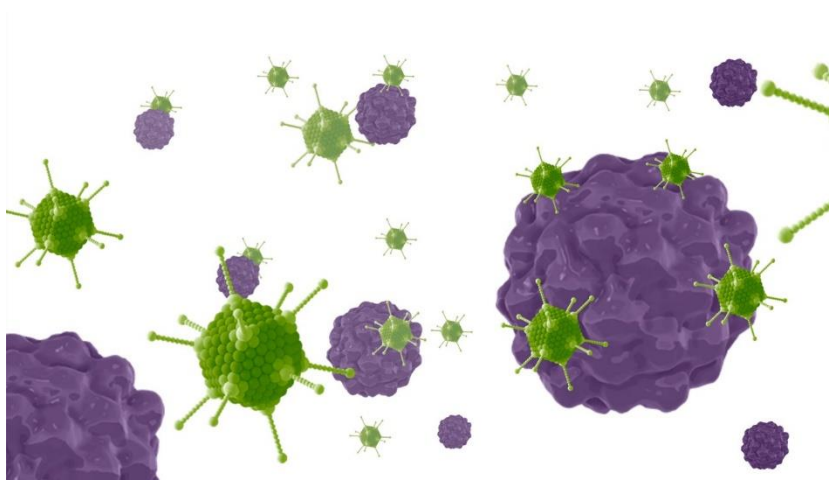
+

Máscara Purificante (1 a 2x por semana)



MONOGRAFIA

“Oncolytic viruses: what to expect from its use in cancer treatment.”



Orientadora: Professora Doutora Ana Miguel Matos

Resumo

Vírus oncolíticos são agentes biológicos capazes de infectar e destruir seletivamente as células tumorais sem causar danos nas restantes. Adicionalmente, têm a capacidade de estimular o sistema imunitário do hospedeiro a atuar no sentido de eliminar o tumor. Os vírus oncolíticos podem ser estirpes selvagens ou vírus geneticamente modificados com o objetivo de aumentar a sua seletividade, eficácia e segurança. A administração destes vírus pode ser realizada em combinação com terapêuticas convencionais, como a quimioterapia, ou abordagens mais recentes, como é o caso dos inibidores de checkpoints. Atualmente, há inúmeros vírus oncolíticos a serem testados em ensaios clínicos para o tratamento de diversos tipos de cancro, o que sugere que esta abordagem pode vir a ser o futuro da terapia oncológica.

Palavras-Chave: vírus oncolíticos, cancro, engenharia genética, terapia combinada.

Abstract

Oncolytic viruses are biologic agents able to selectively infect and destroy cancer cells while sparing the normal ones. Furthermore, they also stimulate host immune system to combat the tumor growth and promote tumor removal. Both wild-type and engineered viruses have been developed for targeting specific cancers and to improve the efficacy and safety of oncolytic virotherapy. Their potential as anticancer agents may also be enhanced through combination with other traditional therapies, like chemotherapy or more recent approaches, such as checkpoint inhibitors. There are many oncolytic viruses currently being tested in clinical trials for the treatment of various types of cancer, suggesting that this approach could become the future of the oncology field.

Keywords: oncolytic viruses, cancer, genetic engineering, combination therapy.

Abbreviations

5-FC – 5-fluorocytosine

5-FU – 5-fluorouracil

ADP – Adenovirus death protein

APC – Antigen-presenting cell

BiTE – Bispecific T-cell engager

CAR – Chimeric antigen receptor

CR – Complete response

DAMP – Damage-associated molecular pattern

DRR – Durable response rate

HDACi – Histone deacetylase inhibitor

H-IPV – Parvovirus HI

HSV – Herpes simplex virus

HSV-TK – Herpes simplex virus thymidine kinase

ICD – Immunogenic cell death

ICI – Immune checkpoint inhibitors

MV – Measles virus

NDV – Newcastle disease virus

NIS – Sodium-iodide symporter

NK – Natural killer

ORR – Objective response rate

OV – Oncolytic virus

OVT – Oncolytic virotherapy

PAMP – Pathogen-associated molecular pattern

PKR – Protein kinase R

PR – Partial response

Rb – Retinoblastoma

TDA – Tumor-derived antigens

TLR – Toll-like receptor

VSV – Vesicular stomatitis virus

VV – Vaccinia virus

γ CD – Yeast cytosine deaminase

Introduction

Cancer is an increasingly prevalent disease and the therapies currently used are, in many cases, not enough effective and are associated with numerous side effects. For this reason, it is necessary to exploit new therapeutic approaches able to selectively eliminate tumor cells without carrying significant associated risks.

Oncolytic virotherapy (OVT) is an emerging approach to treat cancer but the idea is not so recent. After some case reports had demonstrated tumor regression during naturally occurred virus infections, in 1950's researchers started the purposeful administration of virus to rodent models in order to evaluate their potential as anticancer agents. However, many of these attempts had limited success leading to the abandonment of this research field.¹ Later, with the emergence of genetic engineering it became possible to develop oncolytic viruses with improved selectivity, potency and safety. The FDA approval of Talimogene Laherparepvec (T-VEC), an oncolytic virus derived from herpes simplex virus I (HSV-I), in 2015, has boosted the development of new oncolytic viruses for the treatment of various types of cancer² as it is discussed below.

There are some key desirable characteristics that a virus must have to become an oncolytic virus (OV). Firstly, the ability to selectively infect tumor cells without causing damage to the healthy ones, which is influenced by many factors, namely: the overexpression of the receptors to which viruses can bind; the rapid cell division and high metabolic activity characteristic of tumor cells, along with other mechanisms used by those cells to escape immune system.² All these factors further facilitate viral replication. In addition to this naturally occurring selectivity, OVs can be genetically engineered to target cancer cells, as discussed in the section "strategies to improve selectivity". Secondly, an OV should undergo a rapid replication and intratumoral spread in order to produce an anti-tumor effect before being neutralized by the host immune system. Besides, it is also important that most of the population is not previously immunized against the virus. Lastly, an OV should have a good safety profile, causing no collateral damage and pose no risk of transmission in the population.³

Briefly, the main aim of the field is to develop OVs that are efficiently delivered to tumor sites in order to selectively kill tumor cells and trigger an immune response against the tumor without major adverse events and risk of viral shedding.

Mechanism of action

Oncolytic viruses seem to have two main different and complementary mechanisms of action: they act directly inducing tumor cell lysis or apoptosis and indirectly through stimulation of the immune system.²

The process of virus entry into cells starts with specific binding of viral attachment proteins, which are found on viral surface, to a particular receptor on the surface of the host cell. This specificity determines the bonding of a virus to a certain type of host cell. Subsequently, the virus penetrates the cell, simultaneously or followed by uncoating, which allows for viral genome to be accessible for replication. Finally, after the synthesis of viral components and virion assembly, the viral progeny is released from the cell through cellular lysis or exocytosis, with the intent to infect other cells.⁴ In case of OVT, cellular lysis is preferable as the main objective is to destroy tumor cells.

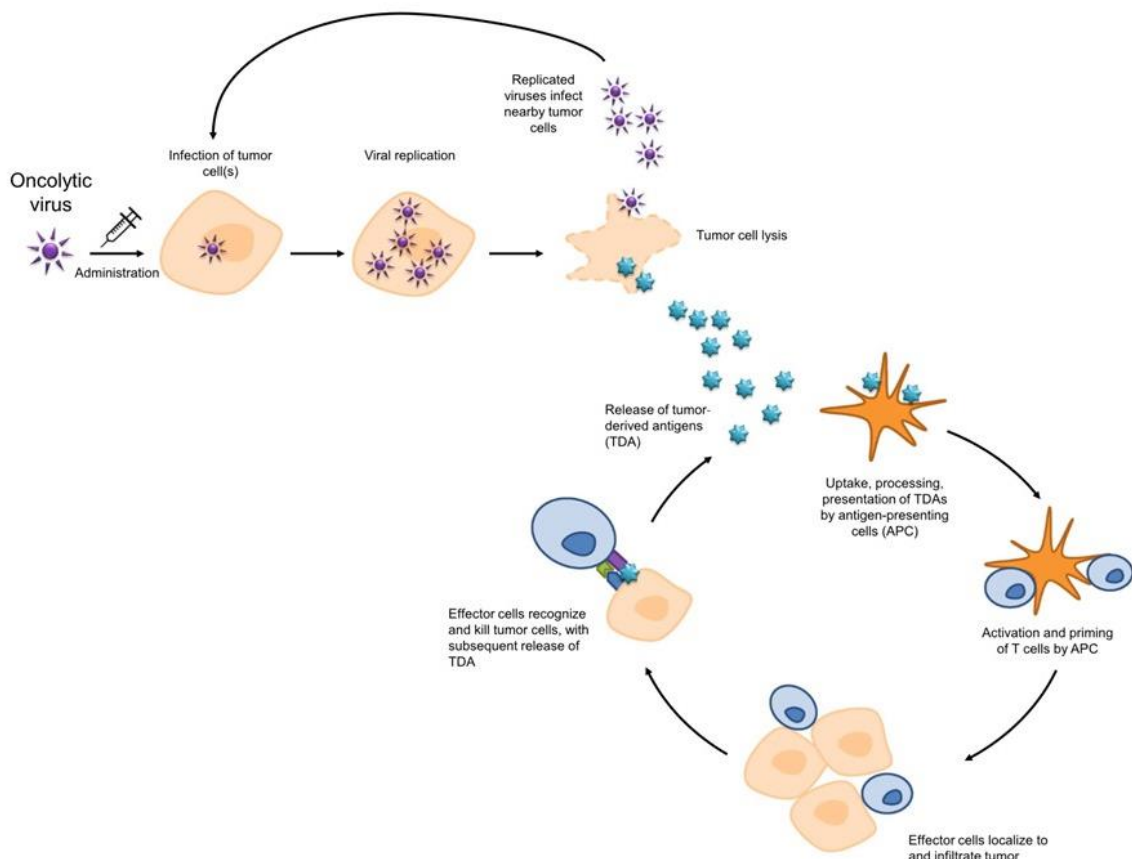


Fig. 1: Viral oncolysis mechanism of action and immunogenic response to viral infection. Lysis of tumor cells following viral replication results in release of tumor-derived antigens (TDAs), which can be recognized by antigen-presenting cells (APCs) resulting in the development of a tumor-specific immune response.⁵

Once the tumor cell is infected, several replication cycles occur culminating in the release of virus through cell lysis, which will then be able to infect adjacent cells. The constant repetition of this process leads to progressive tumor mass destruction.⁵ The cell lysis results in the release of not only viral particles but also tumor-derived antigens (TDAs) and damage-associated molecular pattern (DAMPs), through a process named immunogenic cell death (ICD). These molecules will then induce an immune response, leading to the recruitment of immune system components to the tumor environment, contributing to tumor cells destruction⁶ (Fig.1).

Immune response

One of the aims of using oncolytic viruses as a therapy is to induce an anti-tumor immune response by activating host's immune system. The viral infection results in an increase of pro-inflammatory cytokines, which are responsible for the recruitment and activation of components from innate and adaptive immunity.⁷

The infection of cancer cells by OVs will induce the release of toll-like receptor (TLR) ligands, namely the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and DAMPs, which have a critical role in the activation of antigen-presenting cells (APCs), natural killer (NK) cells and T cells. Thereby, the combination of cytokines and TLR ligands release will antagonize the tumor-induced immune suppression.⁷

The adaptive immune system response is slower but stronger and more specific than the innate one. The main aim of promoting immunity system stimulation by using OVs is to activate T lymphocytes against tumor antigens. In this regard, the anti-tumor immune response will act not only against the primary tumor but also against possible existing metastasis. Additionally, memory T cells might be produced, allowing a later tumor protection in case of relapse.⁸

Even though the immune system has a crucial role in OVT efficiency, it can also constitute a barrier to the therapy since, as expected in any infection caused by foreign pathogens, an immune response is initiated against the virus itself. Also, the destruction of infected cancer cells can extinguish the viral infection earlier than desirable, leading to elimination of the virus before it has been spread enough to achieve the intended therapeutic response. Moreover, in case of intravascular administration, the amount of OV reaching the tumor can be considerably reduced due to the presence of neutralizing antibodies, complement proteins and the possible retention of the virus in organs such as liver and spleen.⁶

The presence of neutralizing antibodies and specific T cells may be due to a previous contact with the virus and, so, the history of exposure to the virus is one of the aspects

contributing to inter-individual variability in OV treatment response, mainly in the first dose. Furthermore, there may also be changes in magnitude of response after each dose as the immunity is progressively acquired.⁹

Hereupon, one of the biggest challenges of OVT is the capacity to manipulate the host immune system to minimize antiviral responses and viral clearance while maintaining the stimulation of an antitumoral response.⁶ The combination of OVT with immunosuppression therapies in certain steps of the process may be beneficial as a way to promote viral replication, however, is necessary to be sure that it will not negatively impact the antitumoral response.²

Development of oncolytic viruses

Oncolytic viruses can be engineered in order to enhance safety and efficacy. Different strategies to improve their selectivity for cancer cells and anti-tumor potency are discussed below, as well as some safety considerations that should be taken into account during OVs development.

Strategies to improve selectivity

Some viruses can be considered naturally occurring oncotropic viruses since they selectively infect tumor cells by taking advantage of cellular changes acquired during carcinogenesis. Examples of these changes are the overexpression of receptors to which viruses bind, defects in the IFN-pathway, activation of RAS-pathway, inactivation of p53, among others.^{7,10}

Despite this ability of many viruses to preferentially grow in tumor cells by nature, various approaches have been exploited to improve their selectivity. At the level of the entry of viruses into cells, the viral surface binding protein can be altered by introducing a single chain antibody or a polypeptide binding ligand to recognize and bind to the receptors on the surface of targeted tumor cells. Measles virus retargeted against human (MV-h-uPA) or mouse (MV-m-uPA) urokinase receptor (uPAR) selectively infects cancer cells with this receptor overexpressed, which occurs in multiple malignancies.¹¹

Another approach to improve the selectivity of viruses to infect tumor cells is the modification at the level of viral replication in order to turn it dependent on specific characteristics of tumor cells. Deleting viral genes that are crucial for viral replication in healthy cells but are unnecessary upon infection of neoplastic cells will lead viruses to selectively replicate in tumor cells.¹⁰ For instance, deletion of the ICP34.5 gene in HSV-1 reduces proliferation in normal cells while still allows it in actively dividing cells. This modification

attenuates neurovirulence of HSV-1 once the inhibition of the gene product disables the capacity of the virus to replicate in the central nervous system.⁵

Placing tissue-specific promoters or tumor-specific antigen promoters upstream of viral genes which are essential for efficient viral replication also ensure that proliferation becomes dependent on characteristics unique to tumor cells. OBP-301 is an oncolytic adenovirus with the hTERT promoter driving the expression of E1 genes. Only tumor cells presenting telomerase activity possess the ability to activate this promoter leading to selective replication.¹¹

MicroRNA targeting is a more recent approach that can also contribute to modify virus tropism. MicroRNAs are small (19-25 nucleotides) non-coding endogenously produced RNAs that can bind to their target mRNAs. The negative regulation in gene expression enables the use of these miRNAs to inhibit viral replication in normal cells.¹² A strong down-regulation of miR-199 occurs in nearly all primary hepatocellular carcinomas whereas it is expressed at substantial level in normal hepatocytes. Ad-199T virus was designed by introducing into the viral genome multiple miR-199 target sites, able to modulate the expression of the *E1A* gene, with the purpose to selectively replicate in miR-199-negative cells and therefore prevents cytolytic activity in healthy cells.¹³

Strategies to improve efficacy

OVs have also been engineered to enhance the cytolytic effect and potentiate the immune response, which can be achieved through genetic engineering.

One possibility to increase the cytotoxicity is arming OVs with genes that lead them to express prodrug-converting enzymes, which convert non-toxic prodrugs into their respective toxic forms at the site of viral replication.¹¹ Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV TK) is an example of a suicide gene that has been inserted in some viruses, like adenoviruses, which are currently being tested in clinical trials. The HSV TK can activate thymidine analogs, like the prodrug ganciclovir by converting it into ganciclovir triphosphate, while normal human TK is not capable of doing that. The product of this conversion is a nucleoside analog, which leads to chain termination and cell death when incorporated into the DNA of replicating cells. In addition, it can diffuse through gap junctions, promoting a bystander effect on neighbouring uninfected cells.^{10,11}

Another approach to increase the potency of oncolytic viruses to kill cells is the expression of cytotoxicity enhancing proteins. Adenovirus death protein (ADP) is a glycoprotein which is needed at late stages of infection for efficient cell lysis and release of

viruses from cells. Viruses in which ADP is overexpressed spread more rapidly and effectively through tumors.^{10,14}

In order to modify the suppressive tumor microenvironment and improve immune-mediated tumor destruction, viruses can be armed with immunostimulatory genes. Cytokines (e.g. IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 and IFN- α/β), chemokines (e.g. CCL5) or costimulatory receptors (e.g. B7.1, 4-1BB CD40L) can induce antitumor immunity.^{15,16} Different viruses with GM-CSF transgene have been widely tested in clinical trials. This cytokine triggers the recruitment of professional APCs therefore promoting presentation of cancer antigens and leading to an influx and maturation of immune cells. It also promotes the activation of NK cells and tumor antigen-specific T cells. T-VEC is the most known example of an oncolytic virus armed with GM-CSF, despite this modification have also been made in some adenoviruses and vaccinia virus.⁶ A vaccinia virus engineered with chemokine CCL5 (RANTES), a molecule that can bind to three receptors expressed on several types of effector and regulatory T cells, showed increased intratumoral lymphocyte infiltration and enhanced antigen-specific antitumor responses in a murine model of colorectal cancer.¹⁷ CD40L, the ligand for CD40, are expressed on CD4⁺ T cells. CD40 ligation enables DCs to activate T cells due to the upregulation of MHC class II and secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-12. For this reason, OV_s armed with a stimulatory CD40 antibody or CD40L were developed to enhance antitumor immunity.¹⁶

Arming OV_s with genes encoding the inhibitors of angiogenesis, as endostatin and angiostatin, also contributes to tumor destruction. In order to demonstrate this, recombinant measles viruses (MV_s) were developed to express human and mouse variants of a secretable endostatin/angiostatin fusion protein known as MV-hE:A and MV-mE:A, respectively. Mice that were given a single intratumoral injection of MV-E:A showed reduced numbers of tumor-associated blood vessels and a trend for increased survival, compared with mice treated with the control virus.¹¹

Serotype switching is an approach that can aid in immune system evasion. It can occur naturally in viruses such as VSV and adenoviruses or it can be mimicked through genetically engineering, which has been done in measles virus.⁷

Other strategy to avoid antibody neutralization and even improve the penetration into the tumor mass, include viral coat modification through the conjugation of polymers, lipid encapsulation or hide the viruses within carrier cell vectors.^{6,18}

Combination of oncolytic virus in prime-boost regimens is an approach a little bit different from those previous mentioned, but which can also be useful to improve anti-tumor activity. An example which is now being tested in a phase I/II clinical trial is the association between an

adenovirus as a prime and a maraba virus as a boosting vector, both encoding the melanoma-associated tumor antigen (MAGEA3).¹⁹ In heterologous prime-boost regimens, the administration of the second OV potentiates the anti-tumor effects generated by the first one, without interference from neutralizing antibodies. This approach has been shown to induce durable adaptive immune responses that primarily target TDAs rather than viral antigens.^{6,20}

Safety considerations

Although just few serious adverse events and minimal mortality were reported from human trials with OVs, safety is always a major concern. OVs need to be meticulously balanced between retaining enough virulence to substantially decrease tumor mass and being sufficiently targeted or attenuated to not cause undesirable effects in the patient. Despite natural and engineered selectivity undoubtedly limits pathogenicity, the possibility of off-target effects still exists, and genetic manipulation may result in unexpected toxic effects.^{2,3}

Furthermore, attention should be drawn to the fact that viruses can evolve since each time the input virus is replicated it results in the generation of quasispecies due to viral polymerases errors. For this reason, an important concern regarding the use of oncolytic infections is the ability of viruses to gain new cell tropisms or lose restriction factors.³

Viral shedding, i.e., the potential to spread the infection to new hosts, is also a worry. In the beginning of first-in-human phase I trials the risk of OV transmission is typically unknown wherefore standard infection containment measures are often implemented and body fluids are carefully monitored for the appearance and disappearance of viral genomes and infectious virus progeny.³ It is possible to engineer oncolytic viruses in a way to preclude the transmission process and it has been done to a measles virus, showing that the virus modified to be incapable of binding to its epithelial cell receptor remains virulent but cannot cross the airway epithelium and therefore is not shed into respiratory secretions.²¹

Pre-existing antiviral immunity in people who are in contact with the treated patient provides protection against virus transmission. However, OVs engineered with modifications made to enhance efficacy, such as those aimed to avoid neutralizing antibodies or to select viruses with low seroprevalence, lead to an increased risk of viral spread.³

The possibility of OVs encoding immunostimulatory genes lead to an excessive expression of immune modulators and, therefore, to an overreaction of the immune system should also be considered, even though such adverse effects have not been reported so far.¹⁶

For the reasons above mentioned and because of the toxicity risks associated with uncontrolled replication of oncolytic viruses, it is important to have mechanisms to abort viral spread if necessary. Incorporation of suicide genes such as HSV-TK allow inhibition of viral

replication by using drugs, therefore increasing safety.¹⁶ Even though oncolytic viruses have shown to be considerably safe up to now, safety profiles might appear less favourable as doses are increased and newer OVs with greater efficacy are advanced to clinical trials.³

Clinical applications

Numerous viruses have been developed and engineered to target and destroy tumor cells in different types of cancer. Many of them have already entered clinical trials and table I briefly presents the conclusions of some published clinical studies. Besides, in this section are discussed the most common viruses used as anticancer agents and some genetic modifications that have been made in order to improve their efficacy and safety.

Table 1: Examples of oncolytic viruses and their clinical applications based on published clinical studies.

Family	Virus	Oncolytic Virus	Design	Clinical application	Published study
dsDNA viruses	Adenoviridae	ONYX-015	E1b-55k deletion	Head and neck cancer	Phase I ²² : well tolerated in combination with cisplatin and 5-fluorouracil; OS including CR were reported.
		ONCOS-102	Chimera Ad5/3; GM-CSF insertion; EAI deletion	Solid tumors	Phase I ²³ : well tolerated; evidence of cellular antitumor immunity.
		DNX-2401 (Delta-24-RGD)	EAI deletion; RGD insertion	Ovarian cancer	Phase I ²⁴ : well tolerated; some SD but no CR or PR reported; potential antitumor immune response.
		CG0070	EAI under control of E2F-1 promoter; E3 deletion; GM-CSF insertion	Glioma	Phase I ²⁵ : radiographic signs of inflammation; tumor infiltration by CD8+ and T-bet+ cells; dramatic responses with long term survival.
		ColoAd1 (Enadenotucirev)	Chimera Ad11/Ad3;	Nonmuscle invasive bladder cancer	Phase I ²⁶ : tolerable safety profile; complete response rate 48.6% and median response duration 10.4 months.
		T-VEC (Talimogene laherparepvec)	ICP34.5 deletion; ICP47 deletion; human GM-CSF insertion	Resectable colorectal cancer (CRC)	Phase I ²⁷ : safe intravenous administration with little or no demonstrable activity in normal tissue; evidence of immune response.
		HF10	Spontaneously mutated	Non-small-cell lung cancer (NSCLC)	Phase II ²⁸ : well tolerated; increased DRR and OS compared with control.
		G207	ICP34.5 deletion; UL39 inactivation through <i>Escherichia Coli lacZ</i> insertion	Urothelial cell cancer (UCC)	Phase I ²⁹ : some cases of partial responses and stable disease reported; all AEs were judged as unrelated to HF10.
		HSV1716	ICP34.5 deletion	Renal cell cancer (RCC)	Phase I ³⁰ : given in combination with radiation demonstrates safety and some radiographic responses.
		PexaVec (JX-594)	TK deletion; GM-CSF insertion	Melanoma	Phase I ³¹ : survival and imaging positive data; lack of toxicity.
Herpesviridae	Herpes simplex virus			Pancreatic cancer	Phase I ³² : safe and well-tolerated without shedding; Viremia consistent with viral replication but no patient had an objective response.
				Malignant glioma	
Poxviridae	Vaccinia Virus			High-grade glioma	
				Extracranial solid tumors in children and young adults	
				Liver cancer	Phase I ³³ : oncolytic and immunotherapeutic effects observed; subject survival duration significantly related to dose.
				Colorectal cancer	Phase I ³⁴ : radiographically stable disease was observed in 67% of the patients; no dose-limiting toxicities were reported.

				Two recombinant viral vectors, each encoding transgenes for PSA and three immune costimulatory molecules (B7.1, ICAM-1, and LFA-3)	Prostvac			Castration-resistant prostate cancer	Phase I ³⁵ : well tolerated; increased OS compared to controls.
				Deletion of viral genes encoding VGF and TK	wDD			Solid tumors	Phase I ³⁶ : No dose-limiting toxicities; no severe adverse events related to treatment; evidence of a prolonged viral replication in tumor tissues.
				Expression of transgenes RUC-GFP, β -glucuronidase and β -galactosidase	GL-ONCI			Locoregionally advanced head and neck carcinoma Peritoneal carcinomatosis	Phase I ³⁷ : combined with cisplatin and radiotherapy; safe and feasible. Phase I ³⁸ : well tolerated; in-patient viral replication and oncolysis were limited to treatment cycle 1; All patients developed neutralizing activities against GL-ONCI.
ssDNA	Parvoviridae	Parvovirus	H-1PV (ParvOryx [®])	Wild-type				Glioblastoma multiforme	Phase I/II ³⁹ : Safe and well tolerated; ability to cross blood-brain/tumor barrier; Favourable PFS compared with historical controls.
dsRNA	Reoviridae	Reovirus	RT3D (Reolysin [®])	Wild-type				Head and neck cancer	Phase I/II ⁴⁰ : well tolerated in combination with carboplatin/paclitaxel; antiviral immune responses were attenuated compared with previous single-agent data for RT3D; some CR, PR and SD were reported.
				Edmonston vaccine measles strain; insertion of sodium-iodide symporter (NIS)	MV-NIS			Advanced malignant melanoma	Phase II ⁴¹ : safe combined with carboplatin and paclitaxel; some PR were reported.
				Lentogenic strain	NDV-HUJ			Ovarian cancer	Phase I ⁴² : well tolerated; promising median overall survival, evidence for immune stimulation; Sodium iodide symporter expression in patient tumors after treatment was confirmed in some patients and associated with long PFS.
				Mesogenic strain	PV701			Glioblastoma multiforme	Phase I/II ⁴³ well tolerated; NDV-HUJ was recovered from blood, saliva, and urine samples; one CR observed.
ssRNA		Coxsackievirus	CVA21 (Cavatac [®])	Wild-type				Advanced solid cancers	Phase I ⁴⁴ : no cumulative toxicity observed; objective responses at higher dose levels.
				Wild-type	SVV-001			Melanoma	Phase II ⁴⁵ : well tolerated; promising survival data; evidence of activity in non-injected distant lesions.
				Wild-type	ECHO-7 (Rigvir [®])			Advanced solid tumors with neuroendocrine features	Phase I ⁴⁶ : well tolerated; predictable viral clearance kinetics; intratumoral viral replication; evidence of antitumor activity in patients with small cell lung cancer.
				Wild-type	Toca-511			Melanoma	Retrospective study ⁴⁷ : well tolerated; increased survival in melanoma patients after surgical excision of the tumor.
				Murine leukemia virus; insertion of yeast cytosine deaminase				High-grade glioma	Phase I ⁴⁸ : well tolerated; increased overall survival compared to external control.

Abbreviations: OS, objective response; CR, complete response; SD, stable disease; PR, partial response; DRR, durable response rate; PFS, progression-free survival.

Adenovirus

Adenoviruses are non-enveloped, double-stranded DNA viruses of *Adenoviridae* family that have been widely studied in oncolytic therapy.

ONYX-015 is an oncolytic adenovirus that was approved by the State Food and Drug Administration in China in 2005 under the name H101.⁴⁹ The deletion of E1B-55k gene was made to this virus in order to improve the selectivity for tumor cells. E1B-55k protein is involved in the blockade of p53, a cellular molecule that can lead to stop of the cell cycle in early stages, or induce cell apoptosis, precluding viral replication. The deletion of E1B-55k prevents the virus from replicating in healthy cells (with functional p53), but still allows viral proliferation within p53 deficient cells, such as some tumor cells.⁵⁰ However, E1B-55k seems to be also involved in the transport of viral mRNA and this deletion can lead to a decrease in viral replication with consequent impact on anti-tumor activity.⁵¹

Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12 is an Adenovirus serotype 5 with an insertion of yCD, TKSR39 and human IL-12 and it is currently being tested in prostate cancer and pancreatic cancer. yCD and TKSR39 are two suicide genes, from a yeast and a virus respectively, which allow the conversion of the prodrugs 5-Fluorocytosine (5-FC) and valganciclovir in their respective toxic forms in infected cells. IL-12 insertion will contribute to the activation of both innate and adaptative immunity, enhancing the immune response against the tumor.⁵²

Many tumor suppressor genes are dysfunctional in cancer cells as, for example, the retinoblastoma (Rb) suppressor gene in malignant gliomas. Viral replication depends on the activity of cellular machinery and Rb protein is involved in the inhibition of cell replication until a cell is ready to divide. For this reason, in case of the oncolytic virus DNX-2104 (Delta-24-RGD), a group of researchers hypothesized that a genetically modified adenovirus unable to bind and inactivate Rb would only be able to replicate in cells which have disrupted Rb function. The deletion of eight amino acids in the Rb-binding region of the E1A protein precludes the inactivation of Rb by the virus therefore preventing its replication in normal cells while allows it in glioma cells that have disrupted Rb function. Cell infection by DNX-2104 depends on anchorage to coxsackie-adenovirus receptor (CAR) and internalization depends on the expression of RGD-related integrins. Because of this, tumor cells expressing low levels of CAR represent a problem to the use of these OVs. In order to circumvent it, DNX-2104 was also modified to target integrins as its primary receptor on the surface of cancer cells and this was achieved by inserting the RGD peptide.⁵³

Tumor selective replication can also be achieved by placing early essential genes under the control of tissue/tumor specific promoters. CG0070 (Fig.2) is a serotype 5 adenovirus

(Ad5) in whose expression of the essential E1A viral genes are driven by human E2F-1 promoter, which is a Rb pathway–defective tumor-specific transcription regulatory element. This virus also encodes GM-CSF, a cytokine with a potent immunostimulatory activity, under control of E3 promoter. Since the E3 promoter is activated by E1A gene product, GM-CSF expression is indirectly under control of the tumor-selective E2F-1 promoter.⁵⁴ There are several strains of adenovirus but serotype 5 is the most commonly used in oncolytic therapy. However, Ad5 binds to CAR whose expression is variable in many cancers as mentioned above.⁵⁵ For that reason, chimeric oncolytic adenovirus as ONCOS-102 (Ad5/3) and ColoAd1 (Ad11/3) were developed since serotype 3 and 11 bind to CD46 and DSG2 instead of CAR.^{56,57} Moreover, the prevalence of neutralizing antibodies against serotype 11 is lower compared to other serotypes, which is an advantage for an intravenous administration.⁵⁸

Herpesvirus

Oncolytic viruses derived from engineered HSV-1 have been largely tested and shown to be promising. Two advantages of the potential use of these viruses as OV's are the fact that it contains numerous nonessential genes, which can be mutated or replaced with large transgenes, along with the availability of drugs such as acyclovir and ganciclovir able to inhibit the viral replication and therefore be used to control adverse effects.²⁹

In 2015, FDA approved one HSV-1 derived oncolytic virus named Talimogene laherparepvec (T-VEC), under the name IMLYGIC[®]. In this virus both copies of the ICP34.5 gene have been deleted, which is a common modification made to oncolytic viruses derived from HSV-1 in order to reduce its neurovirulence, latency and ability to reactivate. As a result of this deletion, viral replication is only allowed in cancer cells with defective protein kinase R (PKR) pathway. One disadvantage of ICP34.5 deletion mutants is a tendency to attenuate virus activity. However, it is possible to make other changes to enhance oncolytic activity. In case of T-VEC (Fig.2), for example, two copies of the human GM-CSF gene were inserted into the deleted ICP34.5 genomic site. GM-CSF promotes the recruitment of dendritic cells leading to an increased antigen presentation to T cells. Another modification that has been done to T-VEC is the deletion of ICP47, which normally blocks presentation of antigens on MHC I. ICP47 deletion not only enhances tumor destruction by increasing the presentation of antigens to T-cells but also improves safety by decreasing the ability of the virus to evade immune recognition in normal cells. In addition, this mutation leads to an early expression of US11 gene whose product can decrease the levels of active PKR somehow compensating for the

attenuating elements of ICP34.5 deletion. This early expression was found to improve oncolytic activity without compromising safety.⁵⁹⁻⁶¹

The randomized phase 3 OPTiM study compares the efficacy between intratumoral injection of T-VEC and subcutaneously administration of GM-CSF to patients with stage IIIB/IIIC/IV unresectable melanoma. The primary outcome measure was durable response rate (DRR), which is defined as the percent of patients with complete response (CR) or partial response (PR) maintained continuously for a minimum of 6 months, and it was improved from 2.1% in GM-CSF arm to 16.3% in T-VEC arm. Secondary outcome measures were also improved with T-VEC, namely overall response rate (5.7% vs 26.4%) and overall survival (18.9 months vs 23.3 months).^{28,62} It is important to refer that no fatal treatment-related adverse events occurred with T-VEC and the most common side effects were fatigue, chills, and pyrexia.⁶² According to clinicaltrials.gov, T-VEC has been tested not only in melanoma but also in pancreatic cancer, breast cancer, hepatocellular carcinoma among others and in some of them it is used in combination with other anti-cancer therapies.

Although only oncolytic viruses derived from HSV-1 entered clinical trials, HSV-2 also shown potential as an anti-cancer agent. An HSV-2 derived oncolytic virus was developed by deleting the protein kinase domain of the viral ICPI0 gene which facilitates HSV-2 replication by activating RAS pathway and suppressing apoptosis. Due to this modification, the virus preferentially replicates in tumor cells in which the RAS pathway is constitutively activated. This virus proved to be more effective than HSV-1 for the treatment of mice bearing metastatic human ovarian tumor xenografts.⁶³

Vaccinia Virus

Vaccinia virus (VV) is a double-stranded DNA virus of the *Poxviridae* family, which have been studied for the treatment of several tumor types. These wide studies are associated with several characteristics of this virus and its life cycle, such as its ability to bind to different receptors. Furthermore, tumors usually have a hypoxic microenvironment and VV has the capacity to replicate in hypoxic conditions, which makes it a promising anti-cancer agent. The short duration of VV life cycle (around 8h) is also an advantage since the virus replicate and kill cancer cells before being itself targeted by the immune system. In addition, since VV entire life cycle takes place in the cytoplasm, there is no risk of genomic integration. Another safety feature associated with the use of VV as oncolytic agent is the fact that it is very sensitive to type I IFN, which confers it a natural selectivity for tumor cells. Finally, its genome size (~192kb) enables the insertion of large transgenes to enhance therapeutic efficacy.²⁰

PexaVec (Fig.2), also known as JX-594, is an oncolytic virus based on the Wyeth strain of VV with TK deletion and engineered to express human GM-CSF in order to stimulate the immune system to kill tumor cells.²⁰ After phase I clinical trials have shown promising results and acceptable safety profiles, a randomized phase II clinical trial designed to investigate the optimal dose of JX-594 intravenously delivered, showed that subject survival duration was significantly related to dose with high doses resulting in higher overall survival. The same study also demonstrated oncolytic and immunotherapeutic effects in response to OV administration.³³ These favourable results led PexaVec to an ongoing phase III clinical trial to determine whether treatment with VV based immunotherapy followed by sorafenib increases survival compared to treatment with sorafenib alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma. PexaVec was also tested in 6 children and adolescents with different types of cancer and it appears to be safe since no serious adverse events attributed to the virus were reported. Some immunological effects due to the injections were found. Four of six patients had stable disease while two had progressive disease in the injected target lesion.⁶⁴

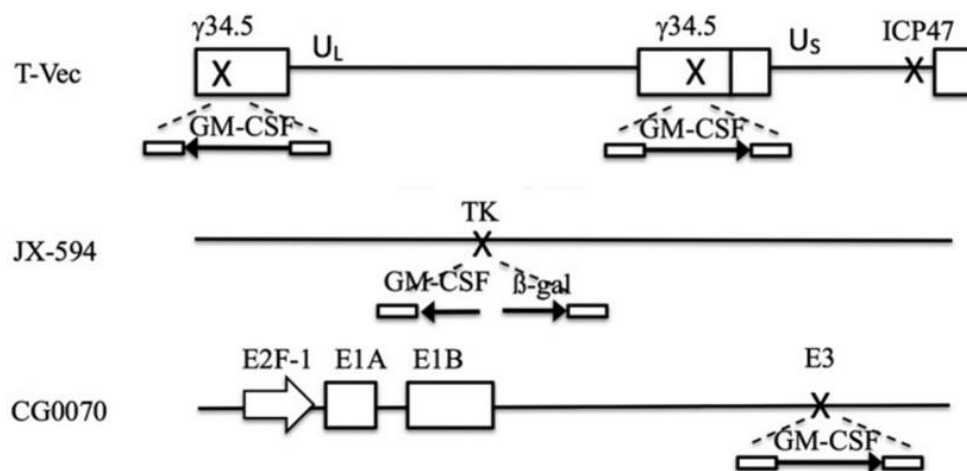


Fig.2: Genetic modifications of T-VEC, JX-594 and CG0070. In T-VEC both copies of the ICP34.5 gene have been deleted and replaced by human GM-CSF. ICP47 gene was also deleted. JX-594 has an insertion of human GM-CSF and lacZ transgenes in the TK locus. CG0070 has E1A viral gene under control of E2F-1 promoter and also encodes GM-CSF.⁶⁵

Other promising anti-cancer agent derived from vaccinia virus is Prostavac, which also reached a phase III clinical trial that has been concluded in 2015 (according to clinicaltrials.gov) but without published results until the moment. Prostavac comprises two different recombinant pox-virus vectors both encoding for Prostatic Specific Antigen (PSA) and a triad of T-cell

costimulatory molecules (TRICOM) including ICAM-1 (CD54), B7.1 (CD80) and LFA-3 (CD58). VV acts as the primary immunotherapy, followed by boosters employing a recombinant fowlpox vector in order to circumvent the rapid appearance of strong neutralizing antibodies against the VV. Since wild-type fowlpox does not replicate in mammalian cells, infection of these cells with the virus do not lead to appearance of neutralizing antibodies therefore recombinant fowlpox viral particles persist for a longer period of time to express transgenes and stimulate T-cell immunity.⁶⁶

Another interesting example of oncolytic vaccinia virus derived with a distinct characteristic is GL-ONC1, which opens up the possibility of real-time monitoring of tumor cell infections due to the expression of RUC-GFP, a fusion protein with potential bioluminescent. In a phase I study of GL-ONC1 in patients with peritoneal carcinomatosis, viral replication and subsequent oncolysis were demonstrated in eight out of nine study patients and all the patients developed neutralizing activities against GL-ONC1.³⁸ The fact of vaccinia virus being easily recognized by the immune system is a major concern, especially because the strains used in OVT are derived from the vaccine developed to eradicate smallpox and so there is an activation of the immune system against the virus in those who were previously immunized. However, satisfactory clinical results have been obtained even in cases of intravenous injection.^{34,20}

Parvovirus

Parvovirus HI (H-IPV) is a rodent virus with linear single-stranded DNA, which entered clinical trials in glioblastoma and pancreatic cancer. Humans are not naturally infected with this virus and therefore there is a lack of pre-existing antiviral immunity, which confers an advantage for OVT using H-IPV.⁶⁷ It is thought that the oncolytic effects result from a combination between the toxic effects of the viral non-structural protein (NS1) and lytic viral replication.^{2,60} The selectivity for tumor cells is due to the high dependence of the viral life cycle upon cellular factors which are dysregulated in many tumors. In addition, NS1 exerts its cytotoxic effects only in transformed cells while sparing the normal ones, despite the complete process remains unknown.⁶⁷ A phase I/IIa glioblastoma trial in eighteen patients in which H-IPV escalating-dose was administered via intratumoral or intravenous injection showed no dose-dependent side effects or dose-limiting toxicity for both administration routes. It also demonstrated the ability of H-IPV to cross the blood-brain/tumor barrier and the capacity for establishing an immunogenic tumor microenvironment.³⁹

Reovirus

The only oncolytic reovirus in clinical development is Reolysin[®], a human reovirus type 3 Dearing strain. This virus can replicate in cancer cells bearing an activated Ras pathway, which happens in two-thirds of human cancer cells. In normal cells, viral transcripts lead to activation of PKR that results in inhibition of protein synthesis and subsequent inhibition of viral replication. On the contrary, cancer cells with an activated Ras pathway have a defective PKR activity therefore allowing viral replication and eventually cell death.⁶⁸ Reolysin[®] has been tested in multiple tumor types and inclusive in young patients. A phase I trial and viral clearance study of this reovirus in children with relapsed or refractory extra-cranial solid tumors demonstrated that it was well tolerated alone and in combination with oral cyclophosphamide. However, there were no objective responses regarding efficacy.⁶⁹ So far, Reolysin[®] entered only one phase III clinical trial in combination with paclitaxel and carboplatin in platinum-refractory head and neck cancers, a study which has been completed in 2014 but whose results remain unpublished. Interestingly, in 2015 FDA has granted Reolysin[®] an orphan drug designation for the treatment of pancreatic cancer, malignant glioma, peritoneal cancer, tube cancer, ovarian cancer and gastric cancer.⁷⁰

Measles Virus

Natural infection with MV can cause fusogenic syncytia formation and cell death. The expression of F and H viral proteins on the cytoplasmic membranes of the infected cells gives these cells highly fusogenic properties. However, wild-type MV may lead to a potentially serious infectious disease and for that reason attenuated strains are preferably used in OVT.⁴²

MV-NIS is an Edmonston-lineage oncolytic measles virus expressing the human thyroidal sodium iodide symporter (NIS) which is currently under study in several clinical trials. Insertion of NIS allows non-invasive imaging of infected cells by using I-123 and enhances radiotherapy by facilitating the uptake of I-131 by infected cells.² MV H-protein can bind to three receptors, namely CD46, SLAM and nectin-4. Although wild-type MV enter cells more effectively through SLAM, the MV vaccine strains enter more effectively via the CD46 receptors.⁶¹ Since CD46 and nectin-4 are consistently expressed at high levels on ovarian tumors, MV-NIS is a promising agent to treat ovarian cancer. In a phase I clinical trial MV-NIS was given intraperitoneally to patients with drug-resistant ovarian cancer and the survival results were promising.⁴² Another type of tumor that overexpresses CD46 is multiple myeloma and MV-NIS is also being tested for treating it in clinical trials with and without cyclophosphamide.⁷¹

Newcastle Disease Virus

Newcastle disease virus (NDV) is an avian paramyxovirus which is not pathogenic to humans but showed significant oncolytic activity against mammalian cancers. Oncolytic mechanisms of action of this virus include formation of syncytia and induction of apoptosis. It is thought that the specificity of NDV for cancer cells is due to defects in the antiviral pathways, namely the IFN pathway. NDV strains can be classified into velogenic (highly pathogenic), mesogenic (moderately pathogenic) or lentogenic (low pathogenic) according to their virulence to avian species. Velogenic and mesogenic are also classified as lytic strains whereas lentogenic are non-lytic.⁷² PV701 is an example of a mesogenic strain tested in a phase I clinical trial for the treatment of advanced cancers.⁴⁴ NDV-HUJ is an example of a lentogenic strain, which was tested in patients with glioblastoma multiforme.⁴³ Both these trials concluded that further studies are needed to evaluate the efficacy of these NDV strains.

Coxsackievirus

A naturally occurring human coxsackievirus A21 (CVA21) is in clinical trials under the name Cavatak[®]. This virus binds to intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and decay acceleration factor (DAF), two cell surface molecules that are overexpressed on certain malignant cells.⁶¹ Cavatak[®] is being tested in clinical trials for the treatment of multiple tumors. A phase II study in patients with stage IIIc and stage IV malignant melanoma has been concluded in 2015. The results were favourable with 38.6% of the patients alive and progression-free after 6 months, an objective response rate (ORR) of 28% with eight patients achieving CR and a DRR of 21% for at least 6 months. In addition, activity in non-injected distant lesions was also shown.⁴⁵

Although only CVA21 entered clinical trials, it is not the only Coxsackievirus with potential as an anti-cancer agent. CVB3 is another example of Coxsackievirus which seems to possess specific oncolytic activity against non-small cell lung cancer, according to preclinical data.⁷³

Seneca Valley Virus

SVV-001 (also called NTX-010) is an oncolytic RNA virus of the *Picornaviridae* family that replicates through an RNA intermediate therefore having no possibility of integration into the host genome. This virus is selective to tumors expressing neuroendocrine features and is able to target and penetrate solid tumors via intravenous administration. Pre-existing antibodies against this virus are rare and since SVV-001 has a short replication cycle (under 12h) it can

promote productive infection within tumors before the development of an immune response.⁷⁴ A phase I clinical study of SVV-001 in advanced solid tumors with neuroendocrine features showed that intravenous administration of this virus is well tolerated. A predictable viral clearance kinetics, intratumoral viral replication and evidence of antitumor activity in patients with small cell lung cancer were also reported.⁴⁶ The safety profile obtained in adults enabled the start of its test in children with relapsed/refractory solid tumors. SVV-001 appears to be feasible and tolerable at the dose levels tested in pediatric patients either alone or in combination with cyclophosphamide. However, despite the addition of cyclophosphamide, neutralizing antibodies still appeared, which limits applicability.⁷⁵

Echovirus

Rigvir[®] is an oncolytic unmodified ECHO-7 virus that belongs to *Picornaviridae* family. Although this virus has been approved in 2004 for the treatment of melanoma in Latvia, limited data exists about it. Despite some case reports has been published, no larger clinical trials were realized.⁷⁶ A retrospective study in seventy-nine patients with early stages of melanoma (IB, IIA, IIB and IIC) who had undergone surgical excision of the primary melanoma tumor showed that patients who received Rigvir[®] after the surgical resection survived longer than those who had surgical resection alone, suggesting that Rigvir[®] have an effect on tumor recurrence. The conclusion of the study was that Rigvir[®] significantly prolongs survival in early-stage melanoma patients without any side effect, however, further investigation is needed to better understand the mechanism of action of Rigvir[®] and its potentially efficacy as anti-cancer agent.^{47,76}

Retrovirus

Retroviral replicating virus can be promising anti-cancer agents since they are selective for both dividing cells and those who have defects in interferon pathway. Although these viruses are nonlytic, they can be armed with suicide genes to mediate cell killing after the administration of prodrugs as 5-fluorocytosine (5-FC). Moreover, the possibility of integration in the host genome and subsequent viral persistence in residual cancer cells enable multiple cycles of prodrug to achieve prolonged survival benefit. Toca-511 is a replication competent retroviral vector derived from murine leukemia virus which encodes yeast cytosine deaminase (yCD) that converts the prodrug 5-FC into the anti-cancer drug 5-fluorouracil (5-FU) in infected cells.⁷⁷ A phase I clinical trial of Toca-511 in forty-five subjects with recurrent or progressive high-grade glioma showed good tolerability and an increased overall survival

compared with an external control.⁴⁸ In 2015 FDA granted orphan drug designation to toca-511 for the treatment of glioblastoma and it is now being tested in a phase II/III clinical trial.⁷⁶

Poliovirus

Although no clinical studies were published until the moment (according to pubmed), Poliovirus is being tested in clinical trials, particularly for the treatment of glioblastoma. This virus enters cells through CD155, which is abundantly expressed in many tumor types conferring this virus selectivity for tumor cells. PVS-RIPO is a live attenuated Sabin type I poliovirus vaccine which contains a foreign internal ribosomal entry site (IRES) of human rhinovirus type 2 in order to reduce neurovirulence. Cytotoxic and immunostimulatory activity of this virus was demonstrated and sustained anti-tumoral responses were achieved in animal tumor models.⁷⁸

Rhabdovirus

Vesicular stomatitis virus (VSV) is a virus of *Rhabdoviridae* family whose natural hosts are insects, cattle, horses and pigs. The lack of pre-existing neutralizing antibodies in human populations is an advantage for the use of VSV as an anti-cancer agent. Despite the inexistence of published clinical studies (to our knowledge), VSV-IFN β -NIS is a VSV derived oncolytic virus with IFN β and human NIS and it is currently being tested in clinical trials. The selectivity of this virus depends on deficient interferon signaling and IFN β insertion seems to attenuate virus infection of healthy cells and to enhance an innate immune response to virus infection in cancer cells, leading to cell recruitment and activation against tumor cells. VSV-IFN β -NIS also encodes human NIS in order to enable non-invasive monitorization of viral infection and it can also potentiate oncolysis through the use of iodine radioisotopes.⁷⁶ Maraba virus is another example of a Rhabdovirus potentially useful in cancer treatment. An attenuated strain, named MGI, which contains G protein and M protein mutations, were engineered to express a melanoma-associated tumor antigen (MAGEA3). Alone, the MGI vaccine appeared insufficient, and it is now being tested in clinical trials as a boosting vector in a heterologous prime-boost regimen, in combination with a non-replicative adenovirus also encoding the antigen MAGEA3.⁷⁹

Combination therapy

Frequently, oncolytic viruses effectively target tumor cells but are not efficacious enough when administered alone. Oncolytic and immunotherapeutic potential of OVT can be optimized through combination therapy with other pharmacologic or immunotherapeutic anti-cancer agents.

Oncolytic virotherapy and chemotherapy

Chemotherapeutic agents are designed to target rapidly dividing cells, and they may not discriminate between cancer cells and normal ones. Since immune system cells divide quickly, especially during an immune response, they are among the targets of chemotherapy, which may lead to a decrease in the immune response against the OV. On the other hand, cellular stress and DNA damage induced by chemotherapy in cancer cells will lead to an ICD and consequent stimulation of an immune response against the tumor.⁸⁰ For the reasons above mentioned, chemotherapy seems to complement virotherapy through various mechanisms, including suppression of antiviral immune responses, direct killing of malignant cells and enhancement of tumor cell immunogenicity.⁶

There are many associations of OV and chemotherapeutic agents currently being tested in clinical trials and some clinical studies have already been published. For example, a phase I/II trial of carboplatin and paclitaxel chemotherapy in combination with intravenous oncolytic reovirus RT3D showed that antiviral immune responses were attenuated compared with previous data for the administration of RT3D alone. The combination was well tolerated and demonstrated activity in head and neck cancer.⁴⁰ In another study, some patients with advanced solid tumors were treated with oncolytic adenovirus in combination with low-dose of cyclophosphamide. Although antibody formation and viral replication were not affected by cyclophosphamide, the combination induced Th1 type immunity on a systemic level in most patients and resulted in higher rates of disease control than the oncolytic virus alone.⁸¹

Oncolytic virotherapy and immune checkpoint inhibitors (ICI)

There are some molecules, called “checkpoints”, on the surface of immune cells that provide the immune system the ability to attack transformed cells while sparing the normal ones. CTLA-4 and PD-1 are two immune checkpoint proteins expressed on the surface of cytotoxic T-cells. In order to suppress antitumor activity, many cancer cells overexpress immune checkpoint regulators like CD80/CD86 and PDL-1 which bind to CTLA-4 and PD-1, respectively, leading to an inhibition of T-cells. Immune checkpoint inhibitors are monoclonal

antibodies that prevent the receptors and ligands from binding to each other thereby precluding the inactivation of T-cells by tumor cells.⁸² Thus, combining OV's with immune checkpoint inhibitors may enhance antitumor immune response. A recent randomized phase II study evaluating the efficacy and safety of T-VEC combined with Ipilimumab (anti-CTLA4) in patients with advanced unresectable melanoma showed that the combination has greater antitumor activity than ipilimumab alone without additional safety issues.⁸³

Other immune checkpoints inhibitors, as pembrolizumab (anti-PD1), are currently being tested in clinical trials in combination with numerous oncolytic virus like Cavatak[®], Reolysin[®] among others. One major concern about immune checkpoint inhibitors is that they can allow the immune system to attack some normal tissues leading to serious side effects. The development of OV's expressing checkpoint inhibitors would allow in situ expression therefore avoiding adverse effects from the systemic delivery of the antibody.² Based on this approach, an influenza A virus encoding a single chain antibody that blocks CTLA4 was developed and showed to delay tumor growth in a mouse melanoma model.⁸⁴

Oncolytic virotherapy and chimeric antigen receptor (CAR) T cells

CAR T-cell therapy consists in genetically modifying T-cells to express CARs that target markers found on cancer cells. Although promising results have been obtained with this approach, there are some issues that need to be circumvented like the poor trafficking of CAR T-cells into the tumor microenvironment and the possibility of off-target effects caused by TDAs that are not only expressed in cancer cells but also in some normal tissues.⁸⁵ A preclinical study showed that combining CAR-T cells with an adenovirus expressing RANTES and IL-15, led to optimal trafficking and survival of CAR-T cells without comprising viral cytopathic effect.⁸⁶ It is even possible to combine OV's simultaneously with CAR-T cells and ICIs as demonstrated in a study where local treatment with an adenovirus expressing IL-12 and a PD-L1 blocking antibody was combined with systemic HER2.CAR-T cell infusion, and led to improved survival compared to either approach alone.⁸⁷

Oncolytic virotherapy and histone deacetylase inhibitors (HDACi)

Alterations in tumor suppressor genes or oncogenes may be due to transcriptional regulation by epigenetic mechanisms, including histone deacetylation by histone deacetylases (HDACs). Many HDACis are increased in malignant cells and have been closely linked with acquisition of malignant phenotypes in carcinogenesis. As epigenetic modifiers of transcription, HDAC inhibitors induce cell cycle arrest and therefore apoptosis in cancer cells.⁸⁸ Because

HDAC have been implicated in modulating the IFN response, combining OV with HDAC inhibitors can boost viral replication and enhance the oncolytic activity.⁸⁹ Valproic acid is an example of a HDACi and pre-treatment with these agent improved the propagation and therapeutic efficacy of oncolytic HSV in a human glioma xenograft model in vivo.⁹⁰ Another study showed that HDACis markedly enhance proliferation of VSV in vitro and in vivo but do not increase OV growth in normal tissues.⁹¹ A more recent study demonstrate that treatment of Reolysin-infected animals with HDACis increased both reovirus cytotoxic effects and anti-tumor immunity.⁹²

Oncolytic virotherapy and bispecific T cell engagers (BiTEs)

BiTEs are bispecific monoclonal antibodies that bind simultaneously to T cell activators on the surface of T cells and a TDA on the surface of cancer cells.⁹³ Since BiTEs have a short half-life, continuous infusion is required. In addition, their application to solid tumors might be limited by penetration issues and dose-limiting toxicities.⁹⁴ The development of OVs encoding BiTEs is a suitable approach to overcome these limitations. Moreover, BiTEs stimulate the immune response directed to only one TDA while the combination will induce immunity to multiple TDAs that are released by dying tumor cells.⁷³ A BiTE that binds to CD3 and the TDA ephrin A2 (EPHA2), was introduced into an oncolytic vaccinia virus (EphA2-TEA-VV) and this approach resulted in tumor-restricted OV infection, localized secretion of the BiTE and T cell-mediated bystander killing of uninfected tumor cells.^{93,95}

A more recent study demonstrated that the combination of a BiTE-expressing oncolytic virus with adoptive CAR-T cell therapy improved antitumor efficacy and prolonged survival in mouse models of cancer when compared with either agent alone, suggesting that this combinatorial therapy can overcome key limitations of CAR-T cells and BiTEs as monotherapies in solid tumors.⁹⁶

Conclusion

Oncolytic virotherapy seems to be a promising approach in the battle against cancer, however, OV_s have had modest clinical success as monotherapy. As previously discussed, this can be overcome by combining OV_s with other therapies. Nevertheless, it might not be that easy since combinatorial therapy may also have some disadvantages that need to be taken into consideration, such as the evidence that many anticancer drugs are cytotoxic or cytostatic, but viruses require actively dividing cells to replicate.¹⁵

Another remaining challenge is the delivery of OV_s (thoroughly reviewed by Oklu, R. et al¹⁸), which can be done by intravascular, intralesional or locoregional administration, depending on the virus and the type of cancer. To conclude, further investigation is needed to fully understand the interactions between tumor cells, virus, and the host, in order to improve OV_s efficacy with tolerable safety profiles. Notwithstanding, there are already many ongoing clinical trials and numerous studies being published at a fascinating rate, suggesting that OV_s can effectively become the future of oncology field.

References

1. KELLY, E. & RUSSELL, S. J. - **History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering.** *Mol. Ther.* 15, 4 (2007) 651–659.
2. LAWLER, S. E., SPERANZA, M.-C., CHO, C.-F. & CHIOCCA, E. A. - **Oncolytic Viruses in Cancer Treatment.** *JAMA Oncol.* 3, 6 (2017) 841.
3. MAROUN, J., MUÑOZ-ALÌA, M., AMMAYAPPAN, A., SCHULZE, A., KAH-WHYE, P. & RUSSELL, S. J. - **Designing and building oncolytic viruses.** *Futur. Virol.* 12, 4 (2017) 193–213.
4. DIMMOCK, N.J., EASTON, A.J., LEPPAR, K.N. - **Virus growth in cells.** In: DIMMOCK, N.J., EASTON, A.J., LEPPAR, K.N. - *Modern Virology*, UK: Blackwell Publishing. 2007, ISBN: 978-1-4051-3645-7. p.61–62.
5. HAMID, O., HOFFNER, B., GASAL, E., HONG, J. & CARVAJAL, R. D. - **Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer.** *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 10 (2017) 1249–1264.
6. FILLEY, A. C. & DEY, M. - **Immune System, Friend or Foe of Oncolytic Virotherapy?** *Front. Oncol.* 7 (2017) 106.
7. JHAWAR, S. R., THANDONI, A., BOMMAREDDY, P.K., HASSAN, S., KOHLHAPP, F.J., GOYAL, S., SCHENKEL, J.M, SILK, A.W. & ZLOZA, A. - **Oncolytic Viruses—Natural and Genetically Engineered Cancer Immunotherapies.** *Front. Oncol.* 7, (2017) 202.
8. MARELLI, G., HOWELLS, A., LEMOINE, N. R. & WANG, Y. - **Oncolytic Viral Therapy and the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer.** *Front. Immunol.* 9, (2018) 866.
9. RUSSELL, S. J. & PENG, K. W. - **Oncolytic Virotherapy: A Contest between Apples and Oranges.** *Mol. Ther.* 25, 5 (2017) 1107–1116.
10. EVERTS, B. & VAN DER POEL, H. G. - **Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer.** *Cancer Gene Ther.* 12, 2 (2005) 141–161.
11. LIN, C. Z., XIANG, G.L, ZHU, X.H., XIU, L.L., SUN, J.X. & ZHANG, X.Y. - **Advances in the mechanisms of action of cancer-targeting oncolytic viruses (review).** *Oncol. Lett.* 15, 4 (2018) 4053–4060.
12. RUIZ, A. J. & RUSSELL, S. J. - **MicroRNAs and oncolytic viruses.** *Curr. Opin. Virol.* 13, (2015) 40–48.
13. CALLEGARI, E., ELAMIN, B.K., D'ABUNDO, L., FALZONI, S., DONVITO, G., MOSHIRI F., MILAZZO M., ALTAVILLA, G., GIACOMELLI, L., FORNARI, F., HEMMINKI, A., DI VIRGILIO, F., GRAMANTIERI, L., NEGRINI, M. & SABBIONI, S. - **Anti-Tumor Activity of a miR-199-dependent Oncolytic Adenovirus.** *PLoS One.* 8, 9 (2013) 1–16.
14. DORONIN, K., TOTH, K., KUPPUSWAMY, M., WARD, P., TOLLEFSON, A.E. & WOLD, W.S. - **Tumor-Specific, Replication-Competent Adenovirus Vectors Overexpressing the Adenovirus Death Protein.** *Journal of Virology.* 74, 13 (2000) 6147–6155.

15. AURELIAN, L. - **Oncolytic viruses as immunotherapy: progress and remaining challenges.** *OncoTargets and Therapy.* 9, (2016) 2627–2637.
16. DE GRAAF, J. F., DE VOR, L., FOUCHIER, R. A. M. & VAN DEN HOOGEN, B. G. - **Armed oncolytic viruses: A kick-start for anti-tumor immunity.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 41, (2018) 28–39.
17. LI, J., O'MALLEY, M., URBAN, J., SAMPATH, P., GUO, Z.S., KALINSKI, P., THORNE, S.H. & BARTLETT, D.L. - **Chemokine Expression From Oncolytic Vaccinia Virus Enhances Vaccine Therapies of Cancer.** *Molecular Therapy.* 19, 4 (2011) 650–657.
18. OKLU, R., ZHOU, Y., EGAN, J. B., DUDA, D. G. & BORAD, M. J. - **Oncolytic virus delivery: from nano- pharmacodynamics to enhanced oncolytic effect.** *Oncolytic Virotherapy.* 6, (2017) 39–49.
19. POL, J. G., ZHANG, L., BRIDLE, B.W., STEPHENSON, K.B., RESSÉGUIER, J., HANSON, S., CHEN, L., KAZDHAN, N., BRAMSON, J.L., STOJDL, D.F., WAN, Y. & LICHTY, B.D. - **Maraba Virus as a Potent Oncolytic Vaccine Vector.** *Molecular Therapy.* 22, 2 (2014) 420–429.
20. HOWELLS, A., MARELLI, G., LEMOINE, N.R., WANG, Y. - **Oncolytic Viruses - Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer.** *Frontiers in Oncology.* 7, (2017) 195.
21. LEONARD, V.H., SINN, P.L., HODGE, G., MIEST, T., DEVAUX, P., OEZGUEN, N., BRAUN, W., MCCRAY, P.B.J., MCCHESENEY, M.B. & CATTANEO, R. - **Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed.** *J. Clin. Invest.* 118, 7 (2008) 2448–2458.
22. KHURI, F. R., NEMUNAITIS, J., GANLY, I., ARSENEAU, J., TANNOCK, I.F., ROMEL, L., GORE, M., IRONSIDE, J., MACDOUGALL, R.H., HEISE, C., RANDLEY, B., GILLENWATER, A.M., BRUSO, P., KAYE, S.B., HONK, W.K. & KIRN, D.H. - **A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer.** *Nat. Med.* 6, 8 (2000) 879–885.
23. RANKI, T., PESONEN, S., HEMMINKI, A., PARTANEN, K., KAIREMO, K., ALANKO, T., LUNDIN, J., LINDER, N., TURKKI, R., RISTIMÄKI, A., JÄGER, E., KARBACH, J., WAHLE, C., KANKAINEN, M., BACKMAN, C., VON EULER, M., HAAVISTO, E., HAKONEN, T., HEISKANEN, R., JADERBERG, M., JUHILA, J., PRIHA, P., SUORANTA, L., VASSILEV, L., VUOLANTO, A. & JOENSUU, T. - **Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors - an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers.** *J. Immunother. Cancer.* 4, (2016) 1–18.
24. KIMBALL, K. J., PREUSS, M.A., BARNES, M.N., WANG, M., SIEGAL, G.P., WAN, W., KUO, H., SADDEKNI, S., STOCKARD, C.R., GRIZZLE, W.E., HARRIS, R.D., AURIGEMMA, R., CUIEL, D.T. & ALVAREZ, R.D. - **A Phase I Study of a Tropism Modified Conditionally Replicative Adenovirus (CRAd) for Recurrent Gynecologic Malignancies.** *Clin Cancer Res.* 16, 21 (2011) 5277–5287.

25. LANG, F.F., CONRAD, C., GOMEZ-MANZANO, C., YUNG, W.K.A., SAWAYA, R., WEINBERG, J.S., PRABHU, S.S., RAO, G., FULLER, G.N., ALDAPE, K.D., GUMIN, J., VENCE, L.M., WISTUBA, I., RODRIGUEZ-CANALES, J., VILLALOBOS, P.A., DIRVEN, C.M.F., TEJADA, S., VALLE, R.D., ALONSO, M.M., EWALD, B., PETERKIN, J.J., TUFARO, F., FUEYO, J. - **Phase I Study of DNX-2401 (Delta-24-RGD) Oncolytic Adenovirus: Replication and Immunotherapeutic Effects in Recurrent Malignant Glioma.** *J. Clin. Oncol.* 36, 14 (2018) 1419–1427.
26. BURKE, J.M., LAMM, D.L., MENG, M.V., NEMUNAITIS, J.J., STEPHENSON, J.J., ARSENEAU, J.C., AIMI, J., LERNER, S., YEUNG, A.W., KAZARIAN, T., MASLYAR, D.J., MCKIERNAN, J.M. - **A first in human phase I study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer.** *J. Urol.* 188, 6 (2012) 2391–2397.
27. GARCIA-CARBONERO, R., SALAZAR, R., DURAN, I., OSMAN-GARCIA, I., PAZARES, L., BOZADA, J.M., BONI, V., BLANC, C., SEYMOUR, L., BEADLE, J., ALVIS, S., CHAMPION, B., CALVO, E., FISHER, K. - **Phase I study of intravenous administration of the chimeric adenovirus enadenotucirev in patients undergoing primary tumor resection.** *J. Immunother. Cancer.* 5, 1 (2017) 1–13.
28. ANDTBACKA, R.H., AGARWALA, S.S., OLLILA, D.W., HALLMEYER, S., MILHEM, M., AMATRUDA, T., NEMUNAITIS, J.J., HARRINGTON, K.J., CHEN, L., SHILKRUT, M., ROSS, M., KAUFMAN, H.L. - **Cutaneous head and neck melanoma in OPTiM , a randomized phase 3 trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for the treatment of unresected stage IIIB / IIIC / IV melanoma.** *Wiley Online Library.* 38, 12 (2016) 1752–1758.
29. NAKAO, A., KASUYA, H., SAHIN, T.T., NOMURA, N., KANZAKI, A., MISAWA, M., SHIROTA, T., YAMADA, S., FUJII, T., SUGIMOTO, H., SHIKANO, T., NOMOTO, S., TAKEDA, S., KODERA, Y., NISHIYAMA, Y. - **A phase I dose-escalation clinical trial of intraoperative direct intratumoral injection of HF10 oncolytic virus in non-resectable patients with advanced pancreatic cancer.** *Cancer Gene Ther.* 18, 3 (2011) 167–175.
30. MARKERT, J.M., RAZDAN, S.N., KUO, H.C., CANTOR, A., KNOLL, A., KARRASCH, M., NABORS, L.B., MARKIEWICZ, M., AGEE, B.S., COLEMAN, J.M., LAKEMAN, A.D., PALMER, C.A., PARKER, J.N., WHITLEY, R.J., WEICHELBAUM, R.R., FIVEASH, J.B., GILLESPIE, G.Y. - **A phase I trial of oncolytic HSV-1, g207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrates safety and radiographic responses.** *Mol. Ther.* 22, 5 (2014) 1048–1055.
31. HARROW, S., PAPANASTASSIOU, V., HARLAND, J., MABBS, R., PETTY, R., FRASER, M., HADLEY, D., PATTERSON, J., BROWN, S.M., RAMPLING, R. - **HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival.** *Gene Therapy,* 11, 22 (2004) 1648–1658.
32. STREBY, K.A., GELLER, J.I., CURRIER, M.A., WARREN, P.S., RACADIO, J.M., TOWBIN, A.J., VAUGHAN, M.R., TRIPLET, M., OTT-NAPIER, K., DISHMAN, D.J., BACKUS, L.R., STOCKMAN, B., BRUNNER, M., SIMPSON, K., SPAVIN, R., CONNER, J., CRIPE, T.P. - **Intratumoral injection of HSV1716, an oncolytic herpes virus, is safe and shows evidence of immune response and viral replication in young cancer patients.** *Clin. Cancer Res.* 23, 14 (2017) 3566–3574.

33. HEO, J., REID, T., RUO, L., BREITBACH, C.J., ROSE, S., BLOOMSTON, M., CHO, M., LIM, H.Y., CHUNG, G.C., KIM, C.W., BURKE, J., LENCIONI, R., HICKMAN, T., MOON, A., LEE, Y.S., KIM, M.K., DANESHMAND, M., DUBOIS, K., LONGPRE, L., NGO, M., ROONEY, C., BELL, J.C., RHEE, B.G., PATT, R., HWANG, T.H. & KIRN, D.H. - **Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer.** *Nat Med.* 19, (2013) 329–336.
34. PARK S.H., BREITBACH, C.J., LEE, J., PARK, J.O., LIM, H.Y., KANG, W.K., MOON, A., MUN, J.H., SOMMERMANN, E.M., MARURI AVIDAL, L., PATT, R., PELUSIO, A., BURKE, J., HWANG, T.H., KIRN, D., PARK, Y.S. - **Phase Ib Trial of Biweekly Intravenous Pexa-Vec (JX-594), an Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Virus in Colorectal Cancer.** *Mol. Ther.* 23, 9 (2015) 1532–1540.
35. KANTOFF, P.W., SCHUETZ, T.J., BLUMENSTEIN, B.A., GLODE, L.M., BILHARTZ, D.L., WYAND, M., MANSON, K., PANICALI, D.L., LAUS, R., SCHLOM, J., DAHUT, W.L., ARLEN, P.M., GULLEY, J.L., GODFREY, W.R. - **Overall Survival Analysis of a Phase II Randomized Controlled Trial of a Poxviral-Based PSA-Targeted Immunotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer.** *J Clin Oncol.* 28, 7 (2010) 1099–1105.
36. DOWNS-CANNER, S., GUO, Z.S., RAVINDRANATHAN, R., BREITBACH, C.J., O'MALLEY M.E., JONES, H.L., MOON, A., MCCART, J.A., SHUAI, Y., ZEH, H.J. & BARTLETT, D.L. - **Phase I Study of Intravenous Oncolytic Poxvirus (vvDD) in Patients With Advanced Solid Cancers.** *Mol. Ther.* 24, 8 (2016) 1492–1501.
37. MELL, L. K., BRUMUND, K. T., DANIELS, G. A. & ADVANI, S. J. - **Phase I Trial of Intravenous Oncolytic Vaccinia Virus (GL-ONCI) with Cisplatin and Radiotherapy in Patients with Locoregionally Advanced Head and Neck Carcinoma.** *Clinical Cancer Research.* 23, 19 (2017) 1078–0432.
38. LAUER, M., SCHELL, M., BEIL, J., BERCHTOLD, S., KOPPENHÖFER, U., GLATZLE, J., KÖNIGSRAINER, A., MÖHLE, R., NANN, D., FEND, F., PFANNENBERG, C., BITZER, M. & MALEK, N.P. - **Phase I study of oncolytic vaccinia virus GL-ONCI in patients with peritoneal carcinomatosis.** *American Association for Cancer Research.* 2018. [Accessed July 2, 2018] Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2018/05/17/1078-0432.CCR-18-0244>
39. GELETNEKY, K., HAJDA, J., ANGELOVA, A.L., LEUCHS, B., CAPPER, D., BARTSCH, A.J., NEUMANN, J.O., SCHÖNING, T., HÜSING, J., BEELTE, B., KIPRIANOVA, I., ROSCHER, M., BHAT, R., VON DEIMLING, A., BRÜCK, W., JUST, A., FREHTMAN, V., LÖBHARD, S., TERLETSKAIA-LADWIG, E., FRY, J., JOCHIMS, K., DANIEL, V., KREBS, O., DAHM, M., HUBER, B., UNTERBERG, A., ROMMELAERE, J. - **Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I / IIa Glioblastoma Trial.** *Mol. Ther.* 25, 12 (2017) 2620–2634.
40. KARAPANAGIOTOU, E.M., ROULSTONE, V., TWIGGER, K., BALL, M., TANAY, M., NUTTING, C., NEWBOLD, K., GORE, M.E., LARKIN, J., SYRIGOS, K.N., COFFEY, M., THOMPSON, B., METTINGER, K., VILE, R.G., PANDHA, H.S., HALL, G.D., MELCHER, A.A., CHESTER, J., HARRINGTON, K.J. - **Phase I/II Trial of Carboplatin and Paclitaxel Chemotherapy in Combination with Intravenous Oncolytic Reovirus in Patients with Advanced Malignancies.** *Clin. Cancer. Res.* 18, 7 (2017) 2080–2089.

41. MAHALINGAM, D. FOUNTZILAS, C., MOSELEY, J., NORONHA, N., TRAN, H., CHAKRABARTY, R., SELVAGGI, G., COFFEY, M., THOMPSON, B., SARANTOPOULOS, J. - **A phase II study of REOLYSIN® (pelareorep) in combination with carboplatin and paclitaxel for patients with advanced malignant melanoma.** *Cancer Chemother. Pharmacol.* 79, 4 (2017) 697–703.
42. GALANIS, E., ATHERTON, P.J., MAURER, M.J., KNUTSON, K.L., DOWDY, S.C., CLIBY, W.A., HALUSKA P. JR., LONG, H.J., OBERG, A., ADERCA, I., BLOCK, M.S., BAKKUM-GAMEZ, J., FEDERSPIEL, M.J., RUSSELL, S.J., KALLI, K.R., KEENEY, G., PENG, K.W., HARTMANN, L.C. - **Oncolytic Measles Virus Expressing the Sodium Iodide Symporter to Treat Drug-Resistant Ovarian Cancer.** *Cancer Res.* 75, 1 (2015) 22–30.
43. FREEMAN, A.I., ZAKAY-RONES, Z., GOMORI, J.M., LINETSKY, E., RASOOLY, L., GREENBAUM, E., ROZENMAN-YAIR, S., PANET, A., LIBSON, E., IRVING, C.S., GALUN, E., SIEGAL, T. - **Phase I / II Trial of Intravenous NDV-HUJ Oncolytic Virus in Recurrent Glioblastoma Multiforme.** *Mol. Ther.* 13, 1 (2006) 221–228.
44. PECORA A.L., RIZVI, N., COHEN, G.I., MEROPOL, N.J., STERMAN, D., MARSHALL, J.L., GOLDBERG, S., GROSS, P., O'NEIL JD, GROENE, W.S., ROBERTS, M.S., RABIN, H., BAMAT, M.K., LORENCE, R.M. - **Phase I Trial of Intravenous Administration of PV701, an Oncolytic Virus, in Patients With Advanced Solid Cancers.** *Journal of Clinical Oncology.* 20, 9 (2002) 2251–2266.
45. ANDTBACKA, R. - **Viralitics Reports Positive Final Results from CAVATAK™ Phase 2 Melanoma Trial.** In: American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, Chicago, 2015.
46. RUDIN, C.M., POIRIER, J.T., SENZER, N.N., STEPHENSON, JR., LOESCH, D., BURROUGHS, K.D., REDDY, P.S., HANN, C.L. & HALLENBECK, P.L. - **Phase I Clinical Study of Seneca Valley Virus (SVV-001), a Replication-Competent Picornavirus, in Advanced Solid Tumors with Neuroendocrine Features.** *Clin. Cancer Res.* 17, 4 (2017) 888–895.
47. DONIÑA, S., STRĚLE, I., PROBOKA, G., AUZIŇŠ, J., ALBERTS, P., JONSSON, B., VENSKUS, D., MUCENIECE, A. - **Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study.** *Melanoma Research.* 25, 5 (2015) 421–426.
48. CLOUGHESY, T.F., LANDOLFI, J., HOGAN, D.J., BLOOMFIELD, S., CARTER, B., CHEN, C.C., ELDER, J.B., KALKANIS, S.N., KESARI, S., LAI, A., LEE, I.Y., LIAU, L.M., MIKKELSEN, T., NGHIEMPHU, P.L., PICCIONI, D., WALBERT, T., CHU, A., DAS, A., DIAGO, O.R., GAMMON, D., GRUBER, H.E., HANNA, M., JOLLY, D.J., KASAHARA, N., MCCARTHY, D., MITCHELL, L., OSTERTAG, D., ROBBINS, J.M., RODRIGUEZ-AGUIRRE, M., VOGELBAUM, M.A. - **Phase I trial of vocimagene amiretrorepvec and 5-fluorocytosine for recurrent high-grade glioma.** 8, (2016) 341–375.
49. GARBER, K. - **China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy for Cancer Treatment.** *J Natl. Cancer Inst.* 98, 5 (2006) 298–300.
50. RIES, S. & KORN, W. M. - **ONYX-015: Mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus.** *Br. J. Cancer.* 86, 1 (2002) 5–11.

51. JIANG H., GOMEZ-MANZANO, C., RIVERA-MOLINA, Y., LANG, F.F., CONRAD, C.A., FUEYO, J. - **Oncolytic adenovirus research evolution: From cell-cycle checkpoints to immune checkpoints.** *Curr. Opin. Virol.* 13, (2015) 33–39.
52. FREYTAG, S. O., BARTON, K. N. & ZHANG, Y. - **Efficacy of oncolytic adenovirus expressing suicide genes and interleukin-12 in preclinical model of prostate cancer.** *Gene Ther.* 20, 12 (2013) 1131–1139.
53. JIANG, H., GOMEZ-MANZANO, C., LANG, F. F., ALEMANY, R. & FUEYO, J. - **Oncolytic adenovirus: preclinical and clinical studies in patients with human malignant gliomas.** *Curr. Gene Ther.* 9, 5 (2009) 422–7.
54. RAMESH, N., GE, Y., ENNIST, D.L., ZHU, M., MINA, M., GANESH, S., REDDY, P.S., YU, D.C. - **CG0070, a Conditionally Replicating Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Armed Oncolytic Adenovirus for the Treatment of Bladder Cancer.** *Clin. Cancer Res.* 12, 1 (2006) 305–313.
55. KOSKI, A., KANGASNIEMI, L., ESCUTENAIRE, S., PESONEN, S., CERULLO, V., DIACONU, I., NOKISALMI, P., RAKI, M., RAJECKI, M., GUSE, K., RANKI, T., OKSANEN, M., HOLM, S.L., HAAVISTO, E., KARIOJA-KALLIO, A., LAASONEN, L., PARTANEN, K., UGOLINI, M., HELMINEN, A., KARLI, E., HANNUKSELA, P., PESONEN, S., JOENSUU, T., KANERVA, A., HEMMINKI, A. - **Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GMCSF.** *Mol. Ther.* 18, 10 (2010) 1874–1884.
56. WANG, H., LI, Z.Y., LIU, Y., PERSSON, J., BEYER, I., MÖLLER, T., KOYUNCU, D., DRESCHER, M.R., STRAUSS, R., ZHANG, X.B., WAHL, J.K., URBAN, N., DRESCHER, C., HEMMINKI, A., FENDER, P. & LIEBER, A. - **Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11, and 14.** *Nat. Med.* 17, 1 (2011) 96–104.
57. ZHANG, Y. & BERGELSON, J. M. - **Adenovirus Receptors.** *J. Virol.* 79, 19 (2005) 12125–12131.
58. DI, Y., SEYMOUR, L. & FISHER, K. - **Activity of a group B oncolytic adenovirus (ColoAd1) in whole human blood.** *Gene Ther.* 21, 4 (2014) 440–443.
59. CONRY, R. M., WESTBROOK, B., MCKEE, S. & GRAHAM, T. - **Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy.** *Hum. Vaccin. Immunother.* 14, 4 (2018) 839–846.
60. DUFFY, M.R., FISHER, K.D., SEYMOUR, L.W. - **Making oncolytic virotherapy a clinical reality: the European contribution.** *Hum. Gene Ther.* 28, 11 (2017) 1033–1046.
61. FOUNTZILAS, C., PATEL, S. & MAHALINGAM, D. - **Review: Oncolytic Virotherapy, updates and future directions.** *Oncotarget.* 8, 60 (2017) 102617–102639.
62. ANDTBACKA, R. H. I., KAUFMAN, F.C., AMATRUDA, T., SENZER, N., CHESNEY, J., DELMAN, K.A., SPITLER, L.E., PUZANOV, I., AGARWALA, S.S., MILHEM, M., CRANMER, L., CURTI, B., LEWIS, K., ROSS, M., GUTHERIE, T., LINETTE, G.P., DANIELS, G.A., HARRINGTON, K., MIDDLETON, M.R., MILLER JR, W.H., ZAGER, J.S., YE, Y., YAO, B., LI, A., DOLEMAN, S., VANDERWALDE, A., GANSERT, J. & COFFIN, R.S. - **Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma.** *J Clin Oncol.* 33, 25 (2015) 2780–2788.

63. FU, X., TAO, L. & ZHANG, X. - **An oncolytic virus derived from type 2 herpes simplex virus has potent therapeutic effect against metastatic ovarian cancer.** *Cancer Gene Therapy.* 14, 5 (2007) 480–487.
64. CRIPE T.P., NGO, M.C., GELLER, J.I., LOUIS, C.U., CURRIER, M.A., RACADIO, J.M., TOWBIN, A.J., ROONEY, C.M., PELUSIO, A., MOON, A., HWANG, T.H., BURKE, J.M., BELL, J.C., KIRN, D.H., BREITBACH, C.J. - **Phase I study of intratumoral Pexa-Vec (JX-594), an oncolytic and immunotherapeutic vaccinia virus, in pediatric cancer patients.** *Mol. Ther.* 23, 3 (2015) 602–608.
65. FUKUHARA, H., INO, Y. & TODO, T. - **Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at Dawn.** *Cancer Sci.* 107, 10 (2016) 1373–1379.
66. SINGH, P., PAL, S.K., ALEX, A. & AGARWAL, N. - **Development of PROSTVAC immunotherapy in prostate cancer.** *Future Oncol.* 11, 15 (2015) 2137–2148.
67. MARCHINI, A., BONIFATI, S., SCOTT, E. M., ANGELOVA, A. L. & ROMMELAERE, J. - **Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications.** *Virology Journal.* 12, (2015) 6.
68. KELLY K., NAWROCKI, S., MITA, A., COFFEY, M., GILES, F.J., MITA, M. - **Reovirus-based therapy for cancer.** *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 7 (2009) 817–830.
69. KOLB, E.A., SAMPSON, V., STABLEY, D., WALTER, A., SOL-CHURCH, K., CRIPE, T., HINGORANI, P., AHERN, C.H., WEIGEL, B.J., ZWIEBEL, J., BLANEY, S.M. - **A Phase I Trial and Viral Clearance Study of Reovirus (Reolysin) in Children with Relapsed or Refractory Extra-cranial Solid Tumors: A Children's Oncology Group Phase I Consortium Report.** *Pediatr Blood Cancer.* 62, 5 (2015) 751–758.
70. U.S FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Search Orphan Drug Designations and Approvals for Reolysin** [Accessed July 2, 2018]. Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/ood/listResult.cfm>
71. DISPENZIERI, A., TONG, C., LAPLANT, B., LACY, M.Q., LAUMANN, K., DINGLI, D., ZHOU, Y., FEDERSPIEL, M.J., GERTZ, M.A., HAYMAN, S., BUADI, F., O'CONNOR, M., LOWE, V.J., PENG, K.W., RUSSELL, S.J. - **Phase I Trial of Systemic Administration of Edmonston Strain of Measles Virus, Genetically Engineered to Express the Sodium Iodide Symporter in Patients with Recurrent or Refractory Multiple Myeloma.** *Leukemia.* 31, 12 (2017) 2791–2798.
72. ZAMARIN, D. & PALESE, P. - **Oncolytic Newcastle Disease Virus for cancer therapy: old challenges and new directions.** *Future Microbiol.* 7, 3 (2012) 347–367.
73. MIYAMOTO, S., INOUE, H., NAKAMURA, T., YAMADA, M., SAKAMOTO, C., URATA, Y., OKAZAKI, T., MARUMOTO, T., TAKAHASHI, A., TAKAYAMA, K., NAKANISHI, Y., SHIMIZU, H., TANI, K. - **Coxsackievirus B3 Is an Oncolytic Virus with Immunostimulatory Properties That Is Active against Lung Adenocarcinoma.** *Cancer Res.* 72, 10 (2012) 2609–2621.
74. BURKE, M. J. - **Oncolytic Seneca Valley Virus: past perspectives and future directions.** *Oncolytic Virotherapy.* 5, (2016) 81–89.

75. BURKE, M.J., AHERN, C., WEIGEL, B.J., POIRIER, J.T., RUDIN, C.M., CHEN, Y., CRIPE, T.P., BERNHARDT, M.B., BLANEY, S.M. - **Phase I Trial of Seneca Valley Virus (NTX-010) in Children with Relapsed / Refractory Solid Tumors: A Report of the Children's Oncology Group.** *Pediatr Blood Cancer.* 62, 5 (2015) 743–750.
76. RUSSELL, L. & PENG, K. - **The emerging role of oncolytic virus therapy against cancer.** *Chin. Clin. Oncol.* 7, 2 (2018) 16.
77. PEREZ, O.D., LOGG, C.R., HIRAOKA, K., DIAGO, O., BURNETT, R., INAGAKI, A., JOLSON, D., AMUNDSON, K., BUCKLEY, T., LOHSE, D., LIN, A., BURRASCANO, C., IBANEZ, C., KASAHARA, N., GRUBER, H.E., JOLLY, D.J. - **Design and Selection of Toca 511 for Clinical Use: Modified Retroviral Replicating Vector With Improved Stability and Gene Expression.** *Molecular Therapy.* 20, 9 (2012) 1689–1698.
78. GROMEIER, M. & NAIR, S. K. - **Recombinant Poliovirus for Cancer Immunotherapy.** *Annu Rev Med.* 69, (2018) 289–299.
79. POL J.G., ZHANG, L., BRIDLE, B.W., STEPHENSON, K.B., RESSÉGUIER, J., HANSON, S., CHEN, L., KAZDHAN, N., BRAMSON, J.L., STOJDL, D.F., WAN, Y., LICHTY, B.D. - **Maraba Virus as a Potent Oncolytic Vaccine Vector.** *Molecular Therapy.* 22, 2 (2014) 420–429.
80. SIMPSON, G. R., RELPH, K., HARRINGTON, K., MELCHER, A. & PANDHA, H. - **Cancer immunotherapy via combining oncolytic virotherapy with chemotherapy: recent advances.** *Oncolytic Virotherapy.* 5, (2016) 1–13.
81. CERULLO, V., DIACONU, I., KANGASNIEMI, L., RAJECKI, M., ESCUTENAIRE, S., KOSKI, A., ROMANO, V., ROUVINEN, N., TUUMINEN, T., LAASONEN, L., PARTANEN, K., KAUPPINEN, S., JOENSUU, T., OKSANEN, M., HOLM, S.L., HAAVISTO, E., KARIOJA-KALLIO, A., KANERVA, A., PESONEN, S., ARSTILA, P.T., HEMMINKI, A. - **Immunological Effects of Low-dose Cyclophosphamide in Cancer Patients Treated With Oncolytic Adenovirus.** *Mol. Ther.* 19, 9 (2009) 1737–1746.
82. DINE, J., GORDON, R., SHAMES, Y., KASLER, M. K. & BURKE, M. B. - **Immune Checkpoint Inhibitors: An Innovation in Immunotherapy for the Treatment and Management of Patients with Cancer.** *Asia Pac J Oncol Nurs.* 4, 2 (2017) 127–135.
83. CHESNEY, J., PUZANOV, I., COLLICCHIO, F., SINGH, P., MILHEM, M.M., GLASPY, J., HAMID, O., ROSS, M., FRIEDLANDER, P., GARBE, C., LOGAN, T.F., HAUSCHILD, A., LEBBÉ, C., CHEN, L., KIM, J.J., GANSERT, J., ANDTBACKA, R.H.I., KAUFMAN, H.L. - **Randomized, Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma.** *Journal of Clinical Oncol.* 36, 17 (2018) 1658–1667.
84. HAMILTON, J. R., VIJAYAKUMAR, G., PALESE, P. - **Report A Recombinant Antibody-Expressing Influenza Virus Delays Tumor Growth in a Mouse Model Report A Recombinant Antibody-Expressing Influenza Virus Delays Tumor Growth in a Mouse Model.** *Cell Rep.* 22, 1 (2018) 1–7.
85. AJINA, A. & MAHER, J. - **Prospects for combined use of oncolytic viruses and CAR T-cells.** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 5, 1 (2017) 90.

86. NISHIO, N. & DOTTI, G. - **Oncolytic virus expressing RANTES and IL-15 enhances function of CAR-modified T cells in solid tumors.** *Oncolimmunology.* 4, 2 (2015) 8–10.
87. SHAW, R. A., PORTER, C.E., WATANABE, N., TANOUE, K., SIKORA, A., GOTTSCHALK, S., BRENNER, M.K., SUZUKI, M. - **Adenovirotherapy delivering cytokine and checkpoint inhibitor augments chimeric antigen receptor T cell against metastatic head and neck cancer.** *Mol. Ther.* 25, 11 (2017) 2440–2451.
88. KIM, H. & BAE, S. - **Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs.** *Am J Transl Res.* 3, 2 (2011) 166–179.
89. NAKASHIMA, H., NGUYEN, T., CHIOCCA, E.A. - **Combining HDAC inhibitors with oncolytic virotherapy for cancer therapy.** *Oncolytic Virotherapy.* 4, (2015) 183–191.
90. OTSUKI, A., PATEL, A., KASAI, K., SUZUKI, M., KUROZUMI, K., CHIOCCA, E.A., SAEKI, Y. - **Histone Deacetylase Inhibitors Augment Antitumor Efficacy of Herpes-based Oncolytic Viruses.** *Molecular Therapy.* 16, 9 (2008) 1546–1555.
91. NGUYÊN, T.L., ABDELBARY, H., ARGUELLO, M., BREITBACH, C., LEVEILLE, S., DIALLO, J.S., YASMEEN, A., BISMAR, T.A., KIRN, D., FALLS, T., SNOULTEN, V.E., VANDERHYDEN, B.C., WERIER, J., ATKINS, H., VÄHÄ-KOSKELA, M.J., STOJDL, D.F., BELL, J.C., HISCOTT, J. - **Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 39 (2008) 14981–14986.
92. JAIME-RAMIREZ, A.C., YU, J.G., CASERTA, E., YOO, J.Y., ZHANG, J., LEE, T.J., HOFMEISTER, C., LEE, J.H., KUMAR, B., PAN, Q., KUMAR, P., BAIOCCHI, R., TEKNOS, T., PICHIORRI, F., KAUR, B., OLD, M. - **Reolysin and Histone Deacetylase Inhibition in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *Mol. Ther. Oncolytics.* 5, (2017) 87–96.
93. TWUMASI-BOATENG, K., PETTIGREW, J. L., KWOK, Y. Y. E., BELL, J. C. & NELSON, B. H. - **Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy.** *Nat. Rev. Cancer.* 18, 7 (2018) 419–432.
94. SCOTT, E. M., DUFFY, M. R., FREEDMAN, J. D., FISHER, K. D. & SEYMOUR, L. W. **Solid Tumor Immunotherapy with T Cell Engager-Armed Oncolytic Viruses.** *Macromol. Biosci.* 18, 1 (2017) 1–10.
95. YU, F., WANG, X., GUO, Z.S., BARTLETT, D.L., GOTTSCHALK, S.M. & SONG, X.T. - **T-cell Engager-armed Oncolytic Vaccinia Virus Significantly Enhances Antitumor Therapy.** *Molecular Therapy.* 22, 1 (2013) 102–111.
96. WING, A., FAJARDO, C.A., POSEY, A.D. JR., SHAW, C., DA, T., YOUNG, R.M., ALEMANY, R., JUNE, C.H., GUEDAN, S. - **Improving CART-Cell Therapy of Solid Tumors with Oncolytic Virus-Driven Production of a Bispecific T-cell Engager.** *Cancer Immunol Res.* 6, 5 (2018) 605–616.