



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA



VIRUS DE LA HEPATITIS C: AVANCES EN EL TRATAMIENTO

María del Mar Reyes Pérez



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
GRADO EN FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

Virus de la hepatitis C: Avances en el tratamiento

AUTORA: María del Mar Reyes Pérez

LUGAR DE PRESENTACIÓN: Aula TIC 3

FECHA DE PRESENTACIÓN: 20 de julio de 2021

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

TUTORA: Cristina Sánchez-Porro Álvarez

COTUTOR: Antonio Ventosa Ucero

TIPOLOGÍA DEL TRABAJO: Revisión bibliográfica

1. RESUMEN

La infección causada por el virus de la hepatitis C supone un problema de salud general, ya que la prevalencia global de esta enfermedad aún se considera elevada y supone al año unos 250.000 fallecimientos. Esta enfermedad puede manifestarse de manera aguda o de manera crónica llegando a situaciones graves como hipertensión portal, cirrosis, carcinoma o incluso la muerte. Esta situación ha supuesto un impulso en la investigación del conocimiento de dicho virus. Para llegar a encontrar nuevos tratamientos o profilaxis, entender el mecanismo de acción del virus de la hepatitis C, así como su morfología y demás características como la transmisión, diagnóstico, epidemiología y clínica es decisivo. En este trabajo, se analizan todas las características del virus, conociendo así su maquinaria proteica constituida por diez proteínas que estarán relacionadas con el proceso de replicación y formación de las partículas virales. Asimismo, se ha estudiado el ciclo vital examinando las etapas claves que serán futuras dianas terapéuticas usadas para la síntesis de nuevos fármacos o prototipos de vacunas. Igualmente, en esta revisión, se han analizado los tratamientos que hoy en día se aplican por parte del Sistema Nacional de Salud, así como los aprobados por la *Food and Drugs Administration*. Sin embargo, a pesar de que la inclusión de esta variedad de fármacos ha supuesto un incremento en el número de curaciones, aún son muchos los obstáculos que hacen que no toda la población pueda acceder a estos tratamientos. Por ello, es importante la investigación de nuevos fármacos más eficientes así como el desarrollo de futuras vacunas para la prevención de esta enfermedad.

Palabras clave: Hepatitis C - AAD - Tratamiento - Vacuna

2. ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ÍNDICE	2
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1. ¿Qué se entiende por virus?.....	4
3.2. ¿Qué es una hepatitis?	5
4. OBJETIVOS	6
5. METODOLOGÍA	7
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
6.1. Virus de la hepatitis C	8
6.1.1. Historia.....	8
6.1.2. Características del virus de la hepatitis C.....	9
6.1.4. Transmisión	15
6.1.5. ¿Cómo evoluciona el virus de la hepatitis C?	15
6.2. Características de la enfermedad	15
6.2.1. Sintomatología de la hepatitis C	15
6.2.2. Epidemiología	16
6.2.3. Diagnóstico	16
6.3. Terapia actual de la hepatitis C	17
6.4. Investigación de nuevas dianas terapéuticas.....	23
6.4.1. Inhibición de la entrada viral.....	23
6.4.2. Inhibición de la replicación viral.....	25
6.4.3. Inhibición de la formación de partículas infecciosas	25
6.5. Desarrollo de la vacuna contra el virus de la hepatitis C	27
6.5.1. ¿Cómo actúa el sistema inmunológico durante la entrada del virus de la hepatitis C?	27
6.5.3. Prototipos de vacunas en desarrollo.....	30
7. CONCLUSIONES	36
8. BIBLIOGRAFÍA	37

ANEXO I. ABREVIATURAS

AAD	Antiviral de acción directa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEEH	Asociación Española para el Estudio del Hígado
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
CCZ	Clorciclizina
DREP	<i>DNA-launched self-amplifying RNA replicon</i>
E1	<i>Envelopment Protein 1</i>
E2	<i>Envelopment Protein 2</i>
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EBR	Elbasvir
EDO	Enfermedad de declaración obligatoria
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EphA2	Ephrin Receptor 2 de tipo A
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEHEP	Grupo de Estudio de Hepatitis Víricas
GLE	Glecaprevir
GZR	Grazoprevir
HCA	Hepatitis C aguda
HCC	Hepatitis C crónica
HVR1	Región hipervariable 1
IFN	Interferón pegilado
igVR	Región variable intergenotípica
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IRES	Internal Ribosome Entry Site
ISG	<i>Interferon-stimulated Gene</i>
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LDLR	<i>Receptores de Low Density Lipoproteins</i>
LDV	Ledipasvir
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MVA	<i>Modified Vaccinia Virus Ankara</i>
NS5A	<i>Nonstructural 5A Protein</i>
NS5B	<i>Nonstructural 5B Protein</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PCR	<i>Polymerase Chains Reaction</i>
PEAHC	Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C
PIB	Pibrentasvir
PRR	<i>Pattern-recognition Receptors</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RVS	Respuesta viral sostenida
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
SNS	Sistema nacional de salud
SOF	Sofosbuvir
SP	Signal Peptidase
SPP	Signal Peptide Peptidase
ssARN	Ácido ribonucleico monocatenario (<i>Single-stranded</i>)
TLR	<i>Toll-like Receptors</i>
SRB1	<i>Scanverger Receptor B1</i>
VEL	Velpatasvir
VHC	Virus de la hepatitis C
VHC-LPs	<i>Virus-like Particles VHC</i>
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VOX	Voxilaprevir

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ¿Qué se entiende por virus?

Los virus son microorganismos acelulares que solo pueden replicarse en las células de otros organismos. Sin embargo, hay controversia sobre si se consideran o no seres vivos, ya que necesitan de un hospedador para multiplicarse, pero una vez lo consiguen pueden replicarse y aumentar sus copias. Además, se pueden aislar y examinar al microscopio electrónico (su tamaño es muy pequeño: entre 20 y 300nm) para observar sus singularidades (Nasir et al., 2020).

Todos estos microorganismos contienen como ácidos nucleicos ADN (ácido desoxiribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico) mono o bicatenario, es decir, de cadena simple o de cadena doble. Además, estos ácidos nucleicos van recubiertos por la cápside, formada por subunidades denominadas capsómeros. Por tanto, a esta estructura compuesta por el material genético y la cápside se la denomina nucleocápside. Opcionalmente, hay virus a los que se les suma una envoltura conformada por carbohidratos y lípidos (a veces, puede contener proteínas formando espículas), dando lugar a virus envueltos.

Los virus pueden infectar a todo tipo de organismos, tanto a humanos y animales como plantas, hongos, protistas (microorganismos eucariotas que no se engloban ni dentro de animales ni plantas ni hongos) e incluso, bacterias. Por ello, podemos diferenciarlos entre virus animales, virus vegetales y bacteriófagos.

Al carecer de las enzimas necesarias para la síntesis de nuevas partículas virales, los virus necesitan de la maquinaria de la célula huésped a la que infectan para completar su ciclo de replicación compuesto por las siguientes etapas: adhesión, penetración, descapsidación, replicación, ensamblaje y liberación (Shors, 2009).

Dada la relevancia de la virología y su estudio para tratar de encontrar un tratamiento eficaz para las enfermedades que pueden llegar a producir, en este estudio bibliográfico se investigará sobre los avances en los tratamientos acerca del virus de la hepatitis C (VHC).

3.2. ¿Qué es una hepatitis?

La hepatitis es una enfermedad inflamatoria hepática. Se considera una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO). La etiología puede ser infecciosa (virus, bacterias), inmune (autoanticuerpos) o tóxica (drogas, alcohol o fármacos) (World Health Organization, 2014). Dentro de las hepatitis víricas se distinguen, hasta la fecha, siete tipos de virus que causan la enfermedad: A, B, C, D, E, F y G. Las hepatitis A y E, habitualmente, son causadas por la ingestión de alimentos o agua contaminados. Las hepatitis B, C y D son causadas por el contacto con fluidos corporales infectados. La vía más común es la transmisión por la infusión de sangre o hemoderivados contaminados. En el caso de la hepatitis B, la principal vía de infección es desde la madre portadora al recién nacido o por relaciones sexuales (Kong et al., 2013).

A continuación, debido a la importancia de la hepatitis C en la actualidad ya que no existe ninguna vacuna comercializada y los pacientes infectados siguen siendo millones en el mundo, se expondrán las características de dicha enfermedad y de su agente infeccioso, así como el tratamiento actual y las principales líneas de investigación.

4. OBJETIVOS

Esta revisión bibliográfica presenta como objetivos generales el análisis de la actual situación de la hepatitis C, así como el estudio de las perspectivas futuras de tratamiento y profilaxis, como es la vacuna. Para ello, se plantean los siguientes objetivos concretos:

- I. Análisis de la morfología del virus y de su ciclo de vida, ya que es esencial para la investigación de antivirales que inhiban alguna proteína constituyente del virus o algún paso del ciclo de replicación.
- II. Estudio de las características asociadas al virus como son la historia, transmisión, sintomatología, y diagnóstico, para entender cómo se desarrolla la enfermedad.
- III. Análisis de la terapéutica actual incluida en el Sistema Nacional de Salud, así como los tratamientos aprobados por la *Food and Drugs Administration*.
- IV. Investigación de nuevas dianas terapéuticas además de los prototipos antivirales que se están estudiando hoy en día.
- V. Estudio del desarrollo de vacunas: cuáles son las limitaciones que hacen que hoy día aún no exista vacuna y las perspectivas futuras de vacunas que avanzan en investigación.

5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de esta revisión bibliográfica se comenzó por estudiar en profundidad las características del virus, ya que es fundamental conocer sus cualidades para así poder entender los mecanismos de acción de los tratamientos anti-VHC. Posteriormente, se hizo una búsqueda exhaustiva de los tratamientos actuales y los nuevos fármacos que siguen en estudio actualmente. Asimismo, también se han estudiado los avances en relación con la vacuna.

Los documentos y libros de los que se extrajo la información fueron obtenidos mediante el Catálogo de la Biblioteca de la Universidad de Sevilla, donde también se accedió a la principal base de datos que se usó para encontrar artículos relacionados: PubMed.

También se incorporaron datos de informes oficiales dedicados a la investigación y vigilancia de la hepatitis, como la Organización Mundial de la Salud, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica e Instituto de Salud Carlos III.

Se examinaron las fichas técnicas de los fármacos estudiados, extraídas de la web de la Agencia Europea del Medicamento y de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.

Para obtener información más concreta se usaron filtros de búsqueda como el año de publicación, obteniendo artículos desde el año 2000 hasta el presente para estudiar las características del virus y desde el año 2015 hasta 2021 para los que analizaban los tratamientos del virus.

Las principales palabras clave utilizadas fueron "hepatitis C virus", "VHC" y "hepatitis"; y como palabras clave secundarias "epidemiology", "treatment", "morphology" y "vaccine".

Para la transcripción de los descriptores utilizados las principales páginas empleadas fueron: Diccionario Linguae inglés-español y Descriptores de Ciencia de la Salud de la Biblioteca virtual en salud.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus* (Collier et al., 2008). Los principales genotipos de este virus son ocho. A su vez, se dividen en 86 subtipos diferentes (1a, 1b, 2a, 2b...) y, probablemente, más subtipos aún sin identificar (Hedskog et al., 2019). Los genotipos predominantes son el 1 y el 3: El genotipo 1 se distribuye, sobre todo, por América del Norte, Australia y Europa, mientras que el genotipo 3 se localiza, principalmente, en Asia (Borgia et al., 2018).

La ARN polimerasa dependiente de ARN o fosfoproteína NS5b (*Nonstructural 5B Protein*) implicada en el proceso de replicación del VHC presenta una tasa de error elevada por lo que esto da lugar a una diversificación del genoma y a la producción de los diferentes genotipos del VHC que difieren en sus secuencias de nucleótidos entre un 30 y un 35%. Además, las secuencias de nucleótidos de los subtipos varían también entre un 20-25%. Aunque los diferentes genotipos y subtipos tienen características biológicas comunes se diferencian en la epidemiología y respuesta a la terapia antiviral. La mayor variación en la secuencia de nucleótidos se observa en las proteínas estructurales, que son más susceptibles a la respuesta inmunitaria, como por ejemplo, la región hipervariable 1 (HVR1) en la terminación amino de E2 (Martínez, Franco, 2020).

6.1.1. Historia

En 2020, los tres investigadores implicados en el hallazgo del virus de la hepatitis C: Harvey James Alter, Michael Houghton y Charles Moen Rice, fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de dicho virus. (The Nobel Prize, 2020)

Una vez descritos los virus de la hepatitis A y de la hepatitis B (cuyo hallazgo hizo que disminuyera la infección transmitida por transfusiones sanguíneas), el grupo de investigación del Dr. Harvey James Alter observó que aún había muchos casos sin esclarecer. Tras sistemáticos estudios se llegó a la conclusión de que había un agente infeccioso desconocido con características víricas que presentó una nueva forma de hepatitis infecciosa, a la que se denominó "hepatitis infecciosa: no A, no B". (The Nobel Prize, 2020)

Fue el Dr. Michel Houghton quien, junto con su equipo de la farmacéutica Chiron, consiguió clarificar la secuencia genómica de este virus. Se usó una nueva metodología en la que se obtuvo ADN de un chimpancé contagiado. Dando por hecho que la mayoría del material genético extraído sería procedente del genoma del chimpancé, los investigadores supusieron que algunos fragmentos resultarían del virus que infectaba al animal. Para identificar qué fragmentos del ADN vírico clonados codificaban las proteínas víricas, se enfrentó este genoma a los anticuerpos aislados de la sangre de personas infectadas con dicho virus. Esto consiguió evidenciar que ese clon derivaba de un nuevo virus de ARN de la familia *Flaviviridae*. A este nuevo virus se le denominó virus de la hepatitis C (Houghton, 2009).

Ante el eminente descubrimiento del virus de la hepatitis C, aún quedaba por explicar si dicho virus era capaz de replicarse él solo y así producir la enfermedad. Para ello, el Dr. Charles Moen Rice observó una región previamente desconocida al final del genoma del virus de la hepatitis C e intuyó que podría ser significativo para la replicación del virus. Asimismo, examinó variaciones genéticas en los ejemplares de virus aislados y planteó la hipótesis de que algunas podrían dificultar la replicación del virus. Mediante ingeniería genética se obtuvo una modificación del ARN del virus de la hepatitis C sin estas variaciones genéticas anteriormente presentadas y se inyectó en hígados de chimpancé. Se observó que el virus era capaz de replicarse y originar la enfermedad de manera similar a como se da manera natural (The Nobel Prize, 2020).

6.1.2. Características del virus de la hepatitis C

Se trata de un virus pequeño de forma icosaédrica y envuelto, de unos 50 nm de diámetro (Figura 1) (Collier et al., 2008).

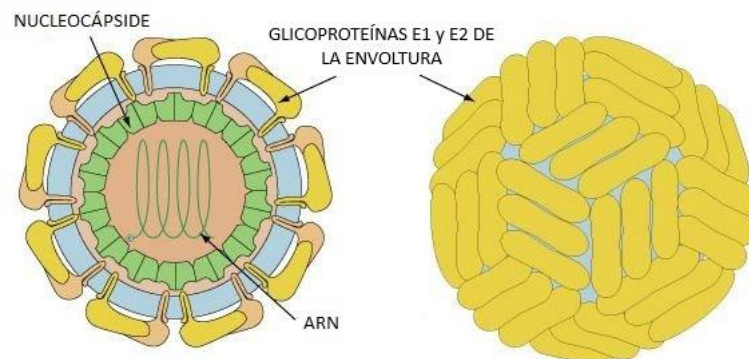


Figura 1: Ilustración modificada de la página web ViralZone sobre la morfología del Virus de la hepatitis C (ViralZone, 2017).

Posee un genoma de 9,8 kilobases, con un marco de lectura y dos regiones no traducidas en el extremo 5' y 3', esenciales en la traducción y replicación, respectivamente (Koutsoudakis et al.,

2013). Es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo que codifica una poliproteína que es procesada por proteasas celulares y virales en diez proteínas diferentes (Ma et al., 2011).

Los diferentes tipos de virus pueden clasificarse según la taxonomía de Baltimore. Esto supone una organización basada en grupos dependiendo del genoma y el método de replicación: Así, se clasificarían en cinco grupos: grupo I (virus de ADN bicatenario), grupo II (virus de ADN monocatenario), grupo III (virus de ARN bicatenario), grupo IV (virus de ARN monocatenario de sentido positivo), grupo V (virus de ARN monocatenario de sentido negativo) y grupo VI (virus de ARN monocatenario con transcriptasa inversa). De esta forma, el virus de la hepatitis c pertenecería al grupo IV, ya que es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo. Al ser ARN de sentido positivo es idéntico a los ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y, por tanto pueden ser traducidos de manera inmediata por la célula huésped (Figura 2) (Mahmoudabadi, Phillips, 2018).

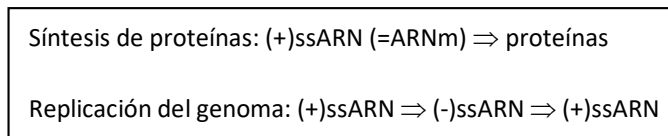


Figura 2: Representación esquemática de la síntesis de proteínas y replicación del genoma del virus de la hepatitis C.

Las proteínas procesadas se dividen, a su vez, en proteínas estructurales y proteínas no estructurales:

Proteínas estructurales

Core. Es la primera proteína codificada en la secuencia del ARN del VHC, encargada de formar la nucleocápside, componente estructural del virión (Koutsoudakis et al., 2013). La proteína traducida consta de 191 aminoácidos. Se libera de la poliproteína viral mediante la acción de las proteasas del huésped SP (*cellular signal peptidase*). Esta región se dirige a la membrana del retículo endoplasmático (RE) donde es procesada por la proteína SPP (*signal-peptide peptidase*), una proteasa aspártica, que la convierte en una proteína madura que contiene tres dominios: el primero en la región N-terminal implicado en la unión al ARN del virus; el segundo interviene en la unión a las LD (estructuras de almacenamiento de lípidos) y el tercer dominio contiene la señal para la transferencia de E1 de la membrana del RE (Morozov et al., 2018).

Proteínas E1 y E2. Estas proteínas (*Envelope Protein 1* y *Envelope Protein 2*, respectivamente) se encuentran en la envoltura (membrana lipídica) formando un heterodímero que es esencial para la introducción, asociación y secreción viral (Freedman et al., 2016). Son proteínas fundamentales en la unión con los receptores (receptor SRB1 (*scanverger receptor B1*), tetraspanina CDB1, claudina-1 y ocludina) para la posterior entrada, principalmente E2 (Figura 3a), ya que la función de E1 (Figura 3b) no se conoce en profundidad. Por lo que podrían ser importantes dianas terapéuticas, aunque su hipervariabilidad dificulta el proceso de búsqueda de vacunas (Yost et al., 2018).

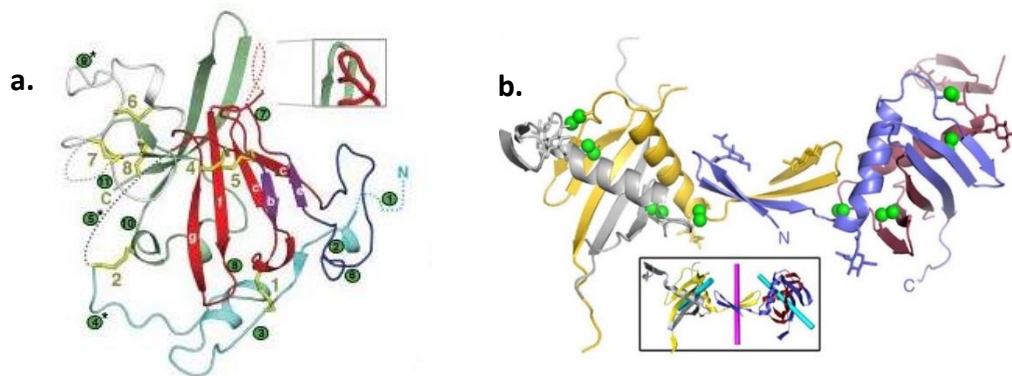


Figura 3: **a**, Estructura de la proteína E2. La capa frontal compuesta por la región N-terminal, se representa de color cian. La capa exterior de color violeta. La capa interior (roja) forma un acoplamiento de Ig. La región flexible (blanco) contiene la región variable 2. La capa posterior, de color verde claro, consta de dos hélices cortas, bucles y una hoja formada por cuatro hebras. Los enlaces disulfuro se muestran como barras horizontales amarillas, numeradas desde el extremo N-terminal. Los glicanos también se numeran desde el extremo N-terminal y se representan por círculos verdes (Kong et al., 2013); **b**, Estructura de la proteína E1. Cada color representa un tipo de monómeros (rojo, azul, gris y amarillo). Los puntos verdes simbolizan residuos de cisteína y las barras, glicanos (Freedman et al., 2016).

Proteínas no estructurales

Proteína p7. Se compone de dos α hélices transmembranas unidas por un bucle que mira hacia el citoplasma (Khaliq et al., 2011). Interviene como canal iónico, encargado de la secreción de iones calcio desde el retículo endoplásmico al citoplasma (Griffin et al., 2003). Se integra dentro de las familias de las viroporinas, es decir, desempeña una labor sustancial en el ensamblaje (ya que se une a las proteínas de la envoltura y a NS2 participando en la organización de las envolturas de los viriones) y liberación de partículas infecciosas de las células infectadas (Madan, Bartenschlager, 2015).

NS2. Proteasa que desempeña una labor significativa en el ensamblaje del virus (Jirasko et al., 2010). Esencial en la replicación del genoma, ya que junto con NS3 forma la proteasa NS2-NS3 que interviene en el sitio de corte entre NS2 (*Nonstructural 2 Protein*)

y NS3 (Dentzer et al., 2009). Asimismo, NS2 también interacciona con p7 y E2 para el ensamblaje de nuevos viriones (Popescu et al., 2011).

NS3 y NS4A. NS3 (*Nonstructural 3 Protein*) es una proteína que contiene en el extremo aminoterminal un dominio serina proteasa (desde el aminoácido 1 al 180) y en el extremo carboxiterminal una actividad helicasa/ATPasa (desde el aminoácido 181 al 631). Su actividad es esencial en la replicación ya que utiliza la energía liberada por el ATP para desenrollar el ADN bicatenario. NS4A (*Nonstructural 4A Protein*) actúa como cofactor de la región serina proteasa de NS3. La proteasa formada por NS3-NS4A es esencial en el ciclo de vida del virus porque cataliza el resto de proteínas no estructurales en los puntos NS3/NS4A NS4A/NS4B NS4B/NS5A y NS5A/NS5B. De este modo, se convierte en una de las dianas más interesantes en la terapia antiviral (Salam, Akimitsu, 2013).

NS4B. Proteína transmembrana (*Nonstructural 4B Protein*) muy hidrofóbica formada por cuatro dominios. Su papel principal es en la remodelación de las membranas intracelulares, formando la denominada *membranous web* fundamental en la constitución del complejo de formación (Ashworth Briggs et al., 2015).

NS5A. Fosfoproteína (*Nonstructural 5A Protein*) que consta de 447 aminoácidos. Formada por tres dominios: dominio I, dímero necesario para la replicación del ARN viral; dominio II, interacciona con proteínas intracelulares (incluyendo la ciclofilina A) y dominio III, esencial para el ensamblaje y secreción del virus (Gao et al., 2016)⁷. Además, interacciona con proteínas celulares como la ciclofilina humana 2 mediante residuos de serina cerca del extremo carboxiterminal produciendo fosforilación, importante para el ensamblaje de partículas infecciosas (Ma et al., 2011).

NS5B. Es una ARN polimerasa dependiente de ARN. Su función es vital y es la responsable de sintetizar el ARN dependiente del cebador. Tiene una estructura típica de mano derecha con "*palma-dedo-pulgar*" (que simula tres dominios aislados en los que la *palma* o centro catalítico quede a distancia de las otras dos regiones de la polimerasa: *dedo* y *pulgar*), haciendo posible que al interaccionar dedos y pulgar quede el centro catalítico en la palma para la síntesis del ARN de la cadena positiva y negativa del virus (Koutsoudakis et al., 2013).

En la *Figura 4* se representa la disposición de las proteínas virales del VHC en el genoma viral:

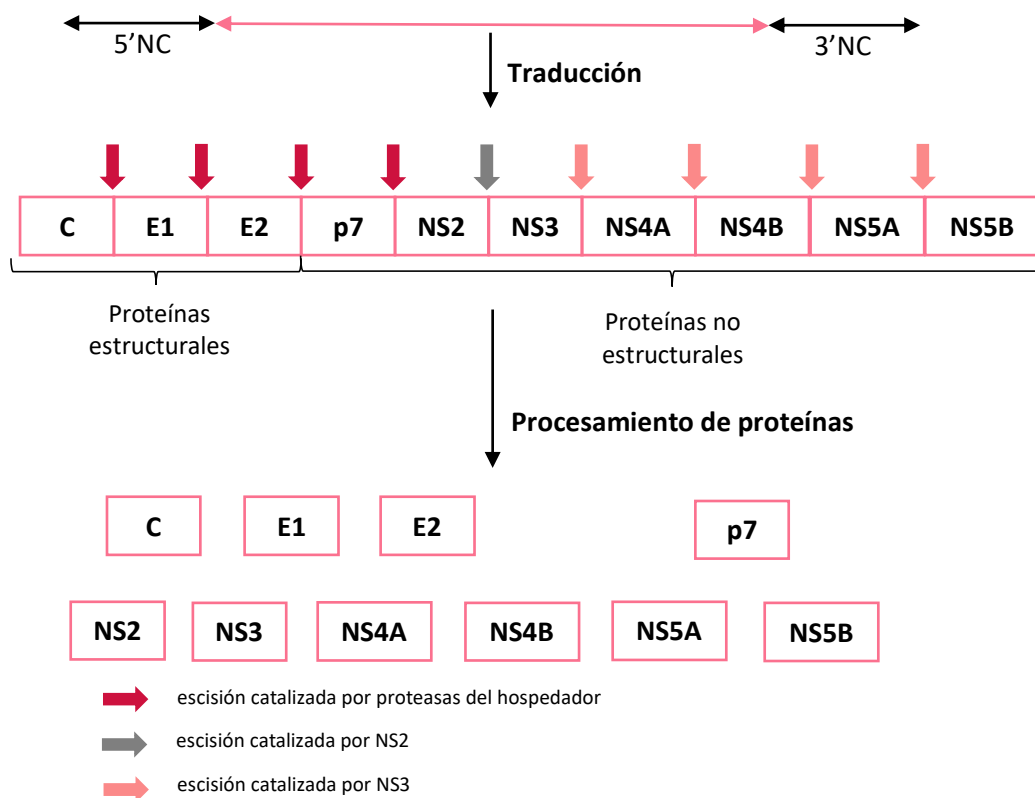


Figura 4: Proteínas virales del virus de la hepatitis C tras la traducción y posterior procesamiento.

6.1.3. Ciclo de vida del virus de la hepatitis C

Las partículas virales viajan libres o agregadas a lipoproteínas. La interacción inicial del VHC se produce con glucosaminoglucanos y receptores de LDL (LDLR) de los hepatocitos. Seguidamente, se produce la interacción con los receptores SRB1 y la tetraspanina CD81.

Una vez se ha unido a estos receptores, la partícula viral es transportada hacia la unión estrecha entre hepatocitos donde se unirá de manera específica a claudina-1 y ocludina (Figura 5).

Recientemente, se han reconocido tres receptores que participan en la endocitosis de las partículas virales. Los receptores EGFR (*epidermal growth factor receptor*) y EphA2 (ephrin receptor 2 de tipo A) que organizan la unión entre claudina-1 y CD81 y la unificación de la envoltura del virus con la membrana plasmática. Además, el receptor NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like*) también tiene una labor en la entrada de VHC, concretamente, en la fusión viral (Koutsoudakis et al., 2013).

Tras la unión, el VHC entra en las células mediante un sistema de endocitosis dependiente de clatrina, moderado por el pH ácido de los endosomas. Dicho endosoma es trasladado hasta el retículo endoplasmático en un procedimiento mediado por dineína. Allí, se acidifica la vesícula haciendo que se funda la membrana viral y endosomal y se libere el ARN al citoplasma (Boulant et al., 2008). El ARN, guiado por el IRES (secuencia de nucleótidos que se encuentra en el extremo 5'UTR para iniciar la traducción), se traduce en una poliproteína. De esta poliproteína, las proteínas estructurales y p7 son cortadas por la peptidasa señal del RE, NS2 se autoescindiría y las proteínas no estructurales son seccionadas por la proteasa viral NS3/4A (Goffard, Dubuisson, 2003).

Las proteínas virales escindidas generan una red membranosa generando una atmósfera propicia para la replicación y ensamblaje del virión. En su interior se configura el complejo de replicación donde la NS5B (ARN polimerasa dependiente de ARN), a partir de la hebra de ARN de polaridad positiva, se genera la hebra de polaridad negativa, que sirve como molde para la síntesis de copias de ARN de cadena positiva (Koutsoudakis et al., 2013).

A continuación, se produce el ensamblaje. La proteína NS5A incorpora el ARN a las proteínas del core conformando la nucleocápside. Estas nucleocápsides son envueltas formando la envoltura viral (con las proteínas E1, E2, p7 y NS2) que procede del RE (Lambert et al., 2014).

Finalmente, la partícula viral ya estaría preparada para ser secretada de la célula por exocitosis (Shors, 2009).

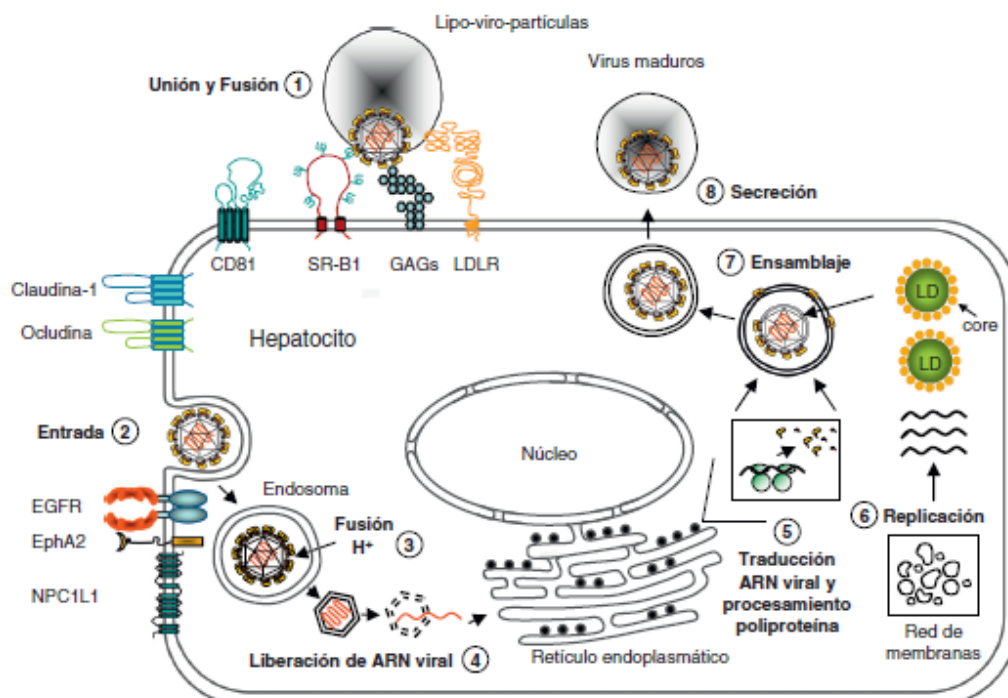


Figura 5: Representación esquemática del ciclo de multiplicación del virus de la hepatitis C (Koutsoudakis et al., 2013).

6.1.4. Transmisión

La transmisión del VHC se da por vía sanguínea. Principalmente, por compartir instrumental de inyección para consumo de drogas. También en transfusiones de sangre, en uso inadecuado de material médico como agujas o jeringas no esterilizadas en ambiente sanitario y en prácticas sexuales que conlleven contacto con sangre.

La vía vertical, es decir, de madre a hijo durante el embarazo o parto, también es posible, aunque es menos frecuente (World Health Organization, 2020).

6.1.5. ¿Cómo evoluciona el virus de la hepatitis C?

Con respecto a la hepatitis C, la enfermedad se puede manifestar de dos formas: de forma aguda o de forma crónica. En la mayoría de pacientes infectados que padecen la forma aguda (alrededor del 30% de las personas), la infección suele remitir a los seis meses sin necesidad de tratamiento y presentan síntomas más leves (Maheshwari et al., 2009). Sin embargo, la forma crónica (que se presenta en el 70% de las personas infectadas, aproximadamente) puede llegar a derivar en una cirrosis hepática en el 15-20% de los pacientes (en un período de unos 20 años) o cáncer de hígado (Rosen, 2011).

6.2. Características de la enfermedad

6.2.1. Sintomatología de la hepatitis C

La hepatitis aguda (HCA) se manifiesta tras un periodo de incubación de unas siete semanas. Alrededor del 80% de los casos serán asintomáticos y son estos, en su mayoría, los que eliminan la enfermedad de manera natural sin que derive en una infección crónica y no suelen precisar tratamiento alguno. Asimismo, no suelen ser diagnosticados ya que no presentan síntomas, por lo que suponen un problema de salud pública ya que presentan la enfermedad y pueden transmitirla. Aquellos con síntomas agudos pueden presentar ictericia (piel amarilla y ojos blancos) seguida de fiebre, fatiga, náuseas, vómitos, dolor abdominal, orina tenue, heces blandas, dolor en las articulaciones. Alrededor de un 20% puede llegar a presentar esplenomegalia (aumento del tamaño del bazo). Tras la infección aguda, aquellos pacientes que no avancen hacia la enfermedad crónica y consigan eliminar la infección, su fase de recuperación postictérica puede demorarse de 2 a 12 semanas (World Health Organization, 2014).

La HCA evoluciona hasta en un 85% de los casos a hepatitis crónica (HCC), superando los seis meses de infección. En la HCC la enfermedad puede evolucionar hasta causar complicaciones como fibrosis hepática, cirrosis o carcinoma hepatocelular (Martínez-Rebollar et al., 2011).

6.2.2. Epidemiología

Se valora que más de 185 millones de personas en todo el mundo presentan anticuerpos contra el VHC. La tasa de prevalencia mundial es del 2,8% y más de 250.000 personas mueren cada año.

En Europa, la prevalencia se sitúa entre el 1-1,5%. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la zona más afectada es el Mediterráneo Oriental, con una tasa de prevalencia del 2,3%. (31) (García y Ricart, 2019)

En España, a lo largo de 2019, se notificaron 1.386 nuevos casos (tasa de incidencia de 3,33 casos por cada 100.000 habitantes), variando este valor según la comunidad autónoma analizada (Figura 6). De los casos notificados, 66 se consideraron "casos agudos", 762 "casos crónicos" y 666 no fueron clasificados porque no había información suficiente (Centro Nacional de Epidemiología, 2020).

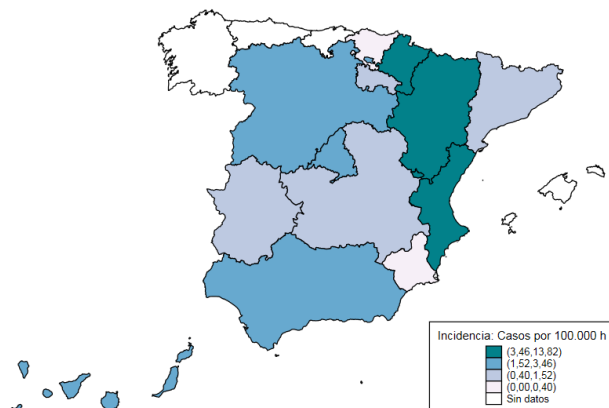


Figura 6: Incidencia de hepatitis C por comunidad autónoma. Tasa por 100.000 habitantes (Centro Nacional de Epidemiología., 2020).

6.2.3. Diagnóstico

Dado que las nuevas infecciones por VHC suelen ser asintomáticas, se pueden diagnosticar muy pocos casos en el momento de la infección aguda. Se estima que tras la infección inicial, hasta un 80% de los casos son asintomáticos.

Por lo general, la infección crónica tampoco se diagnostica, porque se puede mantener asintomática durante décadas, hasta que aparecen los síntomas causados por un daño hepático severo. Esto supone una gran preocupación, ya que estos pacientes no reciben tratamiento y pueden propagar la infección a otras personas sino toman las debidas precauciones (World Health Organization, 2020).

Como en la mayoría de casos estos pacientes son asintomáticos, la enfermedad hepática se detecta durante la exploración por otros motivos rutinarios. Esta se diagnostica en dos etapas: En primer lugar, se realiza una prueba serológica para detectar la presencia de anticuerpos anti-VHC mediante la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). En segundo lugar, si la prueba anterior resultara positiva, para diagnosticar la infección crónica, se realiza la detección del ARN del virus mediante la técnica PCR (*Polymerase Chains Reaction*). Esta segunda prueba se realiza porque hasta un 30% de los pacientes con la enfermedad en estado agudo, eliminan la enfermedad de forma espontánea, pero seguirían dando positivo en una prueba de anticuerpos. De este modo, al utilizar la técnica PCR, que de forma muy sensible detecta el material genético del virus, se asegura el diagnóstico de la infección crónica. Además, gracias a esta prueba también se puede determinar el genotipo del VHC y la carga viral que presenta.

Tras el diagnóstico de infección crónica, se procede a comprobar la magnitud del daño hepático, es decir, si el paciente presentara fibrosis o cirrosis hepática. Esto se realizara mediante biopsia hepática u otras técnicas que el clínico considere (Lozano, 2004).

6.3. Terapia actual de la hepatitis C

El objetivo principal de la terapia contra el VHC es alcanzar una carga viral indetectable mediante los métodos más sensibles (límite inferior de detección de 15 UI/ml). Si no es posible detectar el ARN viral 12 semanas después de la finalización del tratamiento (RVS12), se considera que existe una Respuesta Viral Sostenida (RVS) (García, Ricart, 2019).

Hasta hace unos años, la terapéutica consistía únicamente en una combinación de dos fármacos con acción antivírica indirecta ya que no actuaban sobre el propio virus: Interferón pegilado y ribavirina. El interferón pegilado (IFN) es un tipo de interferón al que se le añade una cadena de polietilenglicol que hace que el fármaco aumente su vida media en el organismo. Su mecanismo de acción consiste en la unión a receptores específicos celulares induciendo la síntesis de enzimas con actividad antivírica por lo que degradan el ARNm vírico y se inhibe la replicación vírica (Carretero, 2006). Por su parte, la ribavirina es un antiviral análogo de nucleósidos que se activa por fosforilación mediante enzimas celulares incrementando la respuesta celular del organismo. Sin embargo, la resistencia de algunos genotipos (en especial, los genotipos 1 y 4) y los efectos secundarios asociados a esta combinación, impulsaron la búsqueda de nuevos fármacos contra el VHC (García, Ricart, 2019).

En 2011, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó la utilización de nuevos agentes antivirales de acción directa (AAD), que actuarían directamente sobre el virus.

Los principales agentes antivirales de acción directa se diferencian en tres terminaciones: "-previr" para aquellos fármacos que actúan como inhibidores de la proteasa NS3/4A, "-asvir" para aquellos fármacos que actúan como inhibidores de la proteína NS5A y "-buvir" para aquellos que actúan como inhibidores de la ARN polimerasa NS5B.

En la tabla 1 se observa la evolución de la terapéutica aprobada por la FDA a partir del año 2011. En dicho año 2011, la FDA aprobó por primera vez la utilización de dos fármacos antivirales: boceprevir y telaprevir, en combinación con IFN y ribavirina. Actualmente, estos medicamentos han sido retirados debido a la superioridad terapéutica de otros agentes antivirales más recientes.

En 2013, se admitieron simeprevir y sofosbuvir. Sin embargo, recientemente, no se recomienda el uso de simeprevir-sofosbuvir, ya que presentan menor eficacia en comparación con los antivirales más recientes (a excepción de zonas donde no haya otra alternativa terapéutica). En cambio, sofosbuvir, es considerado un medicamento esencial por la OMS y se usa en varias terapias combinadas a partir de este momento.

En 2014, se aprueba la combinación de sofosbuvir con ledipasvir para el tratamiento de VHC de genotipo 1. También en este año, se consolida otro tratamiento formado por la combinación de cuatro fármacos: ombitasvir, paritaprevir, ritonavir y dasabuvir, indicado para el genotipo 1.

En 2015, se readapta el tratamiento anteriormente aceptado eliminando el dasabuvir, por lo que la terapéutica consistía en ombitasvir, paritaprevir y ritonavir, indicado especialmente para el genotipo 4.

En 2016, se comienza a usar declatasvir, otro fármaco considerado esencial por la OMS, en combinación con sofosbuvir para el tratamiento de VHC de genotipo 3. También en dicho año, se incorpora el tratamiento formado por elbasvir y grazoprevir, especialmente indicado para el genotipo 1 y 4. Además, se demostró su eficacia en pacientes coinfectados con el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Asimismo, un gran progreso fue la anexión del tratamiento formado por sofosbuvir y velpatasvir, ya que se incorporó como tratamiento de primera línea pangentotípico (es decir, con acción antiviral frente a todos los genotipos) para el VHC crónico con o sin cirrosis.

En 2017, a esta combinación anteriormente formada por la combinación de elbasvir y grazoprevir se añadió voxilaprevir destinado para situaciones en las que los pacientes han sido

tratados previamente con algún inhibidor de NS5A y para los genotipos 1a y 3 que hayan sido tratados previamente con sofosbuvir en ausencia de algún inhibidor de NS5A. De igual manera, en dicho año, se aprobó la combinación de glecaprevir y pibrentasvir, especialmente indicado para pacientes en situación de insuficiencia renal o de fracaso terapéutico anterior (Rabaan et al., 2020)

Tabla 1: Agentes antivirales de acción directa aprobados por la FDA (Elaboración propia basada en Rabaan et al., 2020).

AÑO DE APROBACIÓN POR LA FDA	ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA (AAD)	DIANA TERAPÉUTICA	GENOTIPO DE VHC (GT)
2011	Boceprevir (Marca: Victrelis®)	Inhibidor de la proteasa NS3/4A	GT1
	Telaprevir (Marca: Incivek®)	Inhibidor de la proteasa NS3/4A	GT1
2013	Simeprevir (Marca: Olysio®)	Inhibidor de la proteasa NS3/4A	GT1
	Sofosbuvir (Marca: Sovaldi®)	Inhibidor de la ARN polimerasa dependiente de ARN: NS5B	GT1, GT2, GT3, GT4, GT5, GT6
2014	Sofosbuvir y Ledipasvir (Marca: Harvoni®)	Inhibidor de NS5B e inhibidor de NS5A, respectivamente.	GT1
	Ombitasvir, Paritaprevir, Ritonavir y Dasabuvir (Marca: Viekira Pak®)	Inhibidor de NS5A, inhibidor de la proteasa NS3A/4A, inhibidor de CYP3A (citocromo-P 3A) e inhibidor de NS5B, respectivamente.	GT1
2015	Ombitasvir, Paritaprevir y Ritonavir (Marca: Technivie®)	Inhibidor de NS5A, inhibidor de la proteasa NS3A/4A e inhibidor de CYP3A, respectivamente.	GT4
2015/2016	Daclatasvir (Marca: Daklinza®)	Inhibidor de la proteína reguladora del ciclo: NS5A	GT3 y GT1 en combinación con sofosbuvir
2016	Elbasvir y Grazoprevir (Marca: Zepatier®)	Inhibidor de NS5A e inhibidor de la proteasa NS3/4A, respectivamente	GT1 y GT4
	Sofosbuvir y Velpatasvir (Marca: Epclusa®)	Inhibidor de NS5B e inhibidor de NS5A, respectivamente.	GT1, GT2, GT3, GT4, GT5 y GT6
2017	Sofosbuvir y Velpatasvir y Voxilaprevir (Marca: Vosevi®)	Inhibidor de NS5B, inhibidor de NS5A e inhibidor de proteasa NS3/4A, respectivamente.	GT1, GT2, GT3, GT4, GT5, GT6 (pacientes tratados previamente con algún inhibidor de NS5A) GT1a y GT3 (pacientes tratados previamente con sofosbuvir)
	Glecaprevir y Pibrentasvir (Marca: Mavyret®)	Inhibidor de la proteasa NS3/4A e inhibidor de NS5A, respectivamente	GT1, GT2, GT3, GT4, GT5 y GT6

De este modo, tras haber sido aprobados por la FDA, los siguientes fármacos fueron llegando a España y, posteriormente, incluidos en el listado de medicamentos financiados por el SNS (tabla 2).

Tabla 2: Agentes antivirales de acción directa incluidos en el Sistema Nacional de Salud (Elaboración propia basada en García, Ricart, 2019).

PRINCIPIO ACTIVO	ALTA DE COMERCIALIZACIÓN/ ALTA DE FINANCIACIÓN	TERAPIA QUE SUELE USARSE EN COMBINACIÓN
Sofosbuvir (SOF) (Marca: Sovaldi®)	05-03-2014 / 01-11-2014	
	15-12-2014 / 01-24-2015	SOF + LDV (Harvoni®)
	02-08-2016 / 01-04-2017	SOF + VEL (Epclusa®)
	13-08-2017 / 01-11-2017	SOF + VEL + VOX (Vosevi®)
Ledipasvir (LDV)	15-12-2014 / 01-24-2015	SOF + LDV (Harvoni®)
Elbasvir (EBR)	01-08-2016 / 01-09-2016	EBR + GZR (Zepatier®)
Velpatasvir (VEL)	02-08-2016 / 01-04-2017	VEL + SOF (Epclusa®)
	13-08-2017 / 01-11-2017	SOF + VEL + VOX (Vosevi®)
Pibrentasvir (PIB)	03-08-2017 / 01-11-2017	PIB + GLE (Maviret®)
Voxilaprevir (VOX)	13-08-2017 / 01-11-2017	VOX + SOF + VEL (Vosevi®)
Grazoprevir (GZR)	01-08-2016 / 01-09-2016	GZR + EBR (Zepatier®)
Glecaprevir (GLE)	03-08-2017 / 01-11-2017	GLE + PIB (Maviret®)
Dasabuvir (DSV)	03-02-2015 / 01-04-2015	Exviera®

En España, en octubre de 2020, se rehízo el Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud (PEAHC) con la participación del Grupo de Estudio de Hepatitis Víricas (GEHEP) (perteneciente a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)) y la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), junto con la recomendación de la guía europea European Association for the Study of the Liver (EASL).

Ya que el tratamiento que se le aplique al paciente depende de la situación en la que se encuentre, antes de iniciar cualquier terapia es importante realizarle una analítica completa, conocer el genotipo y subtipo que presenta, determinar la carga viral, el grado de fibrosis que presenta, conocer si es un paciente pretratado fallidamente con otros fármacos o es paciente naive (no ha sido tratamiento anteriormente). Además, es esencial conocer la RVS antes de iniciar el tratamiento y a las doce semanas siguientes de terminar la terapia, para conocer si el tratamiento ha sido eficaz (Asociación Española para el Estudio del Hígado, 2017).

Actualmente, son múltiples las estrategias de terapéutica que encontramos en el Sistema Nacional de Salud (SNS), dependiendo del genotipo que presente el paciente la AEEH recomienda una combinación de fármacos u otra. En la tabla 3 encontramos los medicamentos que se usan hoy en día dependiendo del estado en el que se encuentra el paciente así como su genotipo.

Tabla 3: Estrategia de manejo de la hepatitis C según la AEEH en pacientes que no presentan cirrosis o presentan cirrosis compensada (Elaboración propia basada en Asociación Española para el Estudio del Hígado, 2018)

GENOTIPO	PACIENTES SIN CIRROSIS
GENOTIPO 1a y 1b	<p>PREFERENCIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SOF/VEL durante 12 semanas. • GLE/PIB durante 12 u 8 semanas dependiendo de si el paciente presenta cirrosis o no, respectivamente. • GZR/EBR durante 12 u 8 semanas dependiendo de si el paciente presenta cirrosis o no, respectivamente. <p>ALTERNATIVA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SOF/LDV durante 8 semanas (exceptos en pacientes infectados también con VIH, pacientes cirróticos o que han recibido tratamientos previos con otros AAD o pacientes de raza negra).
GENOTIPO 2	<p>PREFERENCIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SOF/VEL durante 12 semanas. • GLE/PIB durante 8 semanas en pacientes que presentan cirrosis. <p>ALTERNATIVA</p> <ul style="list-style-type: none"> • GLE/PIB durante 12 semanas en pacientes que presentan cirrosis.
GENOTIPO 3	<p>PREFERENCIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SOF/VEL durante 12 semanas. • GLE/PIB durante 8 semanas en pacientes que no presentan cirrosis, 12 semanas en pacientes con cirrosis y 16 semanas en pacientes que presenten cirrosis pretratada con IFN-RBV. <p>ALTERNATIVA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SOF/VEL + RBV en pacientes con cirrosis
GENOTIPO 4	<p>PREFERENCIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SOF/VEL durante 12 semanas • GLE/PIB durante 8 semanas en pacientes que no presenten cirrosis y 12 semanas • GZR/EBR durante 12 semanas en pacientes naive.
GENOTIPOS 5 y 6	<p>PREFERENCIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SOF/VEL durante 12 semanas • GLE/PIB durante 8 semanas en pacientes que no presenten cirrosis y 12 semanas.

Sin embargo, hay situaciones en los que los pacientes, tanto pacientes cirróticos como cirróticos compensados (aquellos que no presentan complicaciones secundarias a la progresión de la enfermedad, como insuficiencia de los hepatocitos y aumento de la presión portal), tienen que recurrir a un tratamiento de rescate guiado al no responder a algún tratamiento anterior con AAD. En estos casos, se procede según el genotipo:

- ⇒ Genotipo 1: Tratamiento de primera línea con SOF/VEL/VOX durante 12 semanas. Como segunda línea, se recomienda GLE/PIB o SOF/VEL.
- ⇒ Genotipo 2: Tratamiento con SOF/VEL/VOX durante 12 semanas y GLE/PIB o SOF/VEL durante 12 semanas también.
- ⇒ Genotipo 3: Tratamiento con SOF/VEL/VOX durante 12 semanas.
- ⇒ Genotipos del 4 al 6: Tratamiento SOF/VEL/VOX durante 12 semanas.

No obstante, en pacientes que presenten cirrosis descompensada lo que se aconseja es acudir al hospital de referencia para analizar la posibilidad de trasplante hepático. Mientras, el tratamiento recomendado sería SOF/VEL más ribavirina durante 12 semanas (si la ribavirina estuviese contraindicada, el tratamiento con SOF/VEL sería de 24 semanas) (García, Ricart, 2019).

Aunque la llegada de los AAD a España en 2014, concretamente Sovaldi (sofosbuvir) al ser el primero, supuso un gran avance para los pacientes afectados por el VHC, debido a su excelente eficacia, su elevado precio impuesto desde el laboratorio Gilead Sciences, lo hacía casi inaccesible para el Sistema Nacional de Salud, ya que rondaba los 25.000 euros por paciente.

En el año 2014, con la llegada de Sovaldi, varias asociaciones como Médicos sin Fronteras o Médicos del Mundo se unieron para intentar que la Oficina Europea de Patentes aboliera la patente que poseía el laboratorio sobre el medicamento, intentando acelerar el proceso de salida de medicamentos genéricos en Europa y hacer más accesible el tratamiento al Sistema Público de Salud. Esto no se consiguió hasta dos años después, 2016, que se revocó parcialmente la licencia.

Sovaldi se incluyó el tratamiento en el SNS, pero debido a su elevado coste, fue restringido a un determinado grupo: pacientes en fase IV en su mayoría y algunos casos en fase III. Siendo tratados solo en 2014 a 500 pacientes. No tardaron en manifestarse numerosos afectados a las puertas del Ministerio de Sanidad exigiendo un tratamiento generalizado a todos los pacientes enfermos.

Posteriormente, el gobierno acordó negociar con la empresa farmacéutica y redujo drásticamente los precios al comprar en grandes cantidades.

6.4. Investigación de nuevas dianas terapéuticas

A pesar de la enorme combinación de tratamientos presentados para cualquier genotipo y la elevada RVS que se ha conseguido alcanzar con dichas combinaciones, sigue existiendo un número importante de pacientes que presenta resistencias a estas terapias. Además, estos tratamientos suelen ser una terapia de larga duración suponiendo un costo elevado, que en muchas ocasiones, sobre todo en países con menos recursos, los pacientes no pueden asumir. Por lo que se han seguido investigando otras alternativas terapéuticas antivirales.

Los diferentes fármacos que se están investigando se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos. Estas fases se dividen en: fase preclínica y fase clínica. La fase preclínica es la síntesis inicial basada en experimentación *in vitro* (experimentación realizada en un tejido vivo fuera de un organismo vivo) e *in vivo* (experimentación realizada en un organismo vivo) y suele tener una duración de 3 o 4 años. Por otro lado, la fase clínica consta de cuatro fases que ya se realizan en el ser humano, concretamente, pacientes voluntarios y que suele oscilar los 10 años englobando todas las fases: fase I (se examina la seguridad del fármaco), fase II (se examina la eficacia terapéutica), fase III (se examina la utilidad comparada con otros fármacos existentes hasta la fecha) y fase IV (es la etapa postcomercialización del fármaco donde se realiza la farmacovigilancia u observación de aparición de posibles efectos adversos) (Armijo, Adín, 2003).

A continuación, se van a detallar los fármacos actuales para el tratamiento de la hepatitis C agrupándolos como inhibidores de la entrada viral, inhibidores de la replicación viral, e inhibidores de la formación de partículas infecciosas. Un resumen de los mismos se muestra en la tabla 4.

6.4.1. Inhibición de la entrada viral

La nueva estrategia antiviral se centra en investigar inhibidores de la entrada viral, a diferencia de los AAD que actuaban sobre la replicación del virus una vez había penetrado en la célula. Estos inhibidores basan su mecanismo de acción en actuar sobre las proteínas que forman la envoltura del virus o en los receptores presentes en los hepatocitos. También, se estudia la acción inhibitoria de estos fármacos sobre la unión de estas proteínas virales con los receptores celulares: E2-tetraspanina C81, E2-SRB1, E1-tetraspanina CD81-cloudina-1.

Uno de estos fármacos en estudio es la **inmunoglobulina policlonal (IgG) Civacir®**, que ha completado con éxito la fase III de ensayo clínico recientemente, cuyo mecanismo de acción se basa en inhibir las proteínas de la envoltura viral E1 y E2. Se ha demostrado tras los estudios de eficacia y seguridad en pseudopartículas de VHC y modelos derivados de cultivos celulares, que

Civacir® neutraliza todos los genotipos de VHC en pacientes antes y después de un trasplante hepático. Dicho fármaco también se prevé que pueda prevenir la recurrencia por trasplante de hígado en pacientes con infección por VHC (Koutsoudakis et al., 2013).

ITX5061 es otro fármaco que ha superado con éxito la fase I de ensayo clínico. Dicho fármaco actúa sobre los receptores celulares SRB1, esenciales para la adhesión de la partícula viral a la célula, inhibiéndolos. En los ensayos clínicos se demostró que los veintitrés pacientes trasplantados infectados con el genotipo 1, a los trece pacientes a los que se les administró el fármaco, en comparación con los diez pacientes control, el tratamiento con ITX5061 resultó en una disminución continua de los niveles de ARN del VHC antes y después del trasplante y tras una semana de tratamiento (Rowe et al., 2016).

En estudios de fase II de ensayo clínico también se encuentra el fármaco **erlotinib**, fármaco anticanceroso aprobado y utilizado en terapéutica presentando buen perfil de seguridad. erlotinib ha manifestado actividad antiviral también *in vitro* como *in vivo*. En cultivos celulares, se ha comprobado que el erlotinib actúa sobre el factor de crecimiento EGFR, esencial en el proceso de endocitosis viral, inhibiéndolo (Koutsoudakis et al., 2013).

Al igual que erlotinib, **ezetimiba**, utilizado actualmente para el tratamiento de la hipercolesterolemia, es otro fármaco que ha demostrado, en ensayo clínico, suficiente actividad antiviral tanto *in vitro* como *in vivo*. Ezetimiba actuaría inhibiendo al receptor NPC1L1 (esencial en la fusión de las partículas virales) puesto que dicho receptor es fundamental en el ciclo enterohepático de las moléculas de colesterol, que están estrechamente ligadas a las partículas virales del VHC ya que estas partículas circulan asociadas a estas lipoproteínas (Monrroy et al., 2017).

Desde el mundo vegetal también encontramos agentes que presentan actividad antiviral. Se ha comprobado que la **rutina** (flavonoide obtenido de *Prunus domestica*) inhibe la unión de las partículas virales de VHC a la célula. Asimismo, la **epigallocatequina-3-galato** (polifenol presente en el té verde) reduce también la penetración viral a los hepatocitos (Rabaan et al., 2020).

Desde el punto de vista de los fármacos neurolépticos como puede ser la **fenotiazina**, también se han comprobado sus efectos antivirales, ya que presentan acción sobre los lípidos y, por tanto, de forma indirecta, sobre el VHC. La **flunarizina**, tratamiento autorizado para la migraña actualmente, ha demostrado efecto inhibitorio sobre la entrada de las partículas virales a la célula, especialmente en el genotipo 2. Sin embargo, se observaron numerosos casos de resistencia asociados a mutaciones en las proteínas E1 y E2 (Prigozhin, Modis, 2016).

En el caso de los antihistamínicos, la **clorciclizina** (CCZ), ha demostrado reducir la entrada de partículas virales. Su efecto se potencia con la combinación de otros AAD como sofosbuvir o daclatasvir. Se observó que reducía la infección, sobre todo, en los genotipos 1b y 2A. A partir del estudio de la clorciclizina se comenzó a investigar derivados de esta molécula más fáciles de obtener. Se obtuvieron seis compuestos aquirales, a diferencia de la CCZ, que eran más fáciles de sintetizar y que presentaban menor efecto antihistamínico, por lo que fueron datos positivos porque así se evitaban efectos fuera de la acción antiviral. De los seis compuestos, el más destacable fue un análogo de la **piperazina** que presentaba un grupo alquilo en el nitrógeno de la molécula. Se analizó que, en combinación con otros AAD, presentaba una reducción de la carga viral del virus durante cuatro semanas en tres de cada cuatro ratones estudiados. Esto supuso un avance ya que presentaba una asequibilidad terapéutica (Rabaan et al., 2020).

6.4.2. Inhibición de la replicación viral

Uno de los nuevos prototipos de inhibidores que se está estudiando es **alisporivir**, una ciclofilina, análoga de ciclosporina A, que no tiene efecto inmunosupresor al no interactuar con la calcineurina. Su eficacia ha sido demostrada en estudios *in vivo*. *In vitro*, ha demostrado su acción inhibitoria impidiendo la interacción entre la proteína NS5A del VHC y la ciclofilina A.

Otra diana terapéutica que está cobrando especial relevancia es el miRNA-122, un tipo de ARN presente en el hígado que se une al extremo 5' del VHC permitiendo su replicación. Se ha evidenciado que el **oligonucleótido antisentido miravirsén** es un inhibidor de este tipo de ARN. Además, en los ensayos con chimpancé se ha comprobado que, tras la administración de este oligonucleótido, la carga viral desciende considerablemente, evitando así efectos adversos muy graves. Asimismo, es efectivo en los genotipos del 1 al 6 (Koutsoudakis et al., 2013).

6.4.3. Inhibición de la formación de partículas infecciosas

La formación correcta de las proteínas E1 y E2 es esencial para el plegamiento de nuevas partículas virales. Recientemente, se han descubierto varios fármacos con acción inhibitoria de las proteínas E1 y E2: **Derivado de bencimidazol**: Impide la entrada de las partículas virales a nivel de los hepatocitos; **cinaropicrina y grosheimol**: lactonas sesquiterpénicas de las que aún no se conoce su mecanismo de acción; **saikosaponina b2**: acción específica sobre E2 con actividad pangenotípica y **anticuerpos monoclonales**: sobre todo para genotipos 1 y 2, se dirigen frente a E1 y E2 (Li, De Clercq, 2017).

La proteína p7 puede ser otro objetivo interesante. Al inhibir la proteína p7, el ciclo vital del virus no puede completarse por lo que no se formarían las partículas virales infecciosas. Aunque los medicamentos analizados para esta diana hasta el día de hoy no son muy robustos, destaca la **rimantadina** aunque aún está en fase de estudio (Li, De Clercq, 2017).

Por otro lado, debido a que las partículas están asociadas a lipoproteínas como es el VLDL, estas también podrían ser una posible diana. Uno de los posibles inhibidores es el flavonoide **naringenina** ya que inhibe la producción de VLDL mediante la inhibición de ApoB (Aguilar-Guadarrama, Rios, 2018)

Tabla 4: Fármacos en investigación para el tratamiento de la hepatitis C (Elaboración propia).

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	FÁRMACO EN INVESTIGACIÓN	DIANA TERAPÉUTICA	FASE DE ENSAYO CLÍNICO
Inhibición de la entrada viral	Civacir®	E1 y E2	Fase III
	ITX5061	SRB1	Fase I
	erlotinib	EGFR	Fase II
	ezetimiba	NPC1L1	Fase II
	rutina y epigallocatequina-3-galato	penetración a los hepatocitos	Fase I
	fenotiazina	LDL	Fase I
	flunarizina	E1	Fase I
	clorciclizina	penetración a los hepatocitos	Fase preclínica
	piperazina	penetración a los hepatocitos	Fase preclínica
Inhibición de la replicación viral	alisorvir	Unión entre NSSA y ciclofilina A	Fase preclínica
	miravirsén	miRNA-122	Fase preclínica
Inhibición de la formación de partículas infecciosas	bencimidazol	penetración a los hepatocitos	Fase preclínica
	cinaropicrina y grosheimol	*	Fase preclínica
	saikosaponina b2	E2	Fase preclínica
	anticuerpos monoclonales	E1 y E2	Fase preclínica
	rimantadina	p7	Fase preclínica
	naringenina	VLDL	Fase preclínica

* Se desconoce su mecanismo de acción

6.5. Desarrollo de la vacuna contra el virus de la hepatitis C

Actualmente, la terapia AAD se asocia con una tasa de erradicación del virus de más del 90%. Las autoridades de salud pública, incluida la OMS, han formulado una estrategia para eliminar el VHC a escala mundial para 2030, cuyos objetivos son la reducción de la incidencia del VHC en un 80% y la tasa de mortalidad asociada con el VHC en un 65%.

Sin embargo, el abuso de sustancias inyectables como drogas intravenosas, reinfecciones tras el tratamiento con AAD y el alto costo de los tratamientos, han limitado el acceso a la terapia antiviral. Por ello, el desarrollo de una vacuna contra el VHC es una herramienta esencial para lograr este objetivo (McConnell, Lim, 2018).

El escenario ideal del que se partió al inicio de las investigaciones sobre la vacuna, era el de conseguir una inmunidad esterilizante, es decir, producir anticuerpos neutralizantes que eliminen las partículas virales antes de que infecten otras células. Sin embargo, el 80% de los pacientes que sufren la reinfección alcanzan la RVS, reduciéndose los niveles de ARN viral significativamente y acortando el tiempo de infección. Por lo que esto indica que la infección inicial puede conducir al establecimiento de la memoria inmunológica, controlando significativamente la posterior infección por VHC. Esto supone un punto de inflexión en el desarrollo de las vacunas, ya que esta respuesta protectora incluye tanto la respuesta inmune humoral como la respuesta inmune celular, sin conducir a una inmunidad estéril, pudiendo prevenir infecciones crónicas.

6.5.1. ¿Cómo actúa el sistema inmunológico durante la entrada del virus de la hepatitis C?

La respuesta innata del hígado se da mediante las células de Kupffer, células NK (Natural Killer), células estrelladas hepáticas y macrófagos. Las partículas virales presentan patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMP), es decir, una secuencia de moléculas, como son las glicoproteínas E1 y E2, proteínas virales y material genético que serán reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern-recognition receptors* - PRR), como son los receptores tipo toll (TLR) y los receptores tipo NOD (NLR). La activación de esta cascada da lugar a la producción de citoquinas inflamatorias como son la interleucina-1 (IL-1), interleucina-18 (IL-18) e interferones I y II (IFN-I e IFN-II). Al estimular esta serie de interferones, se activan los genes estimulados por interferones (*Interferon-stimulated gene* - ISG) que iniciarán las vías de señalización del sistema inmunológico innato. Sin embargo, las proteínas E2, NS3/4A y NS5A interrumpen esta cascada de activación del sistema

inmunológico por lo que la respuesta inmune innata es incapaz de eliminar las partículas virales de VHC (Duncan et al., 2020).

Dado que la inmunidad innata es incapaz de actuar, es aquí donde comienza a actuar la inmunidad adquirida celular. Los casos de pacientes con curación espontánea se han asociado a una inmunidad adquirida eficiente. La respuesta celular está basada en los linfocitos T, concretamente los linfocitos T CD8+ y los linfocitos T CD4+ (auxiliares de los CD8). Estos se encargan de destruir las células infectadas por el virus, dirigiéndose a determinados epítomos (proteínas estructurales y no estructurales): Para ello, el linfocito tiene que reconocer los antígenos mostrados en la superficie de las células infectadas. Esto se consigue mediante los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) El complejo MHC-I presentará en la superficie celular los antígenos para que las células T CD8+ reconozcan a esa célula como infectada por VHC y el complejo MHC-II realizará el mismo proceso pero para las células T CD4+. Las células T CD4+ son auxiliares de las CD8+, refuerzan la memoria de las células T mediante la producción de citoquinas y, además, ayudan a la activación de las células B.

Estos dos tipos de células T son detectables dentro de las doce primeras semanas de la enfermedad. Si la infección evoluciona a la cronicidad, la producción de células T CD4+ comienza a descender y esto conlleva a una actividad de las células T CD8+ desregulada. Esto ocurre a consecuencia de una respuesta del sistema inmunológico del huésped, ya que una activación antigénica durante un tiempo demasiado elevado llevaría a una producción de citoquinas en exceso y podría dañar aún más el hígado.

Con respecto a la inmunidad adquirida humoral, mediada por linfocitos B o anticuerpos neutralizantes, estos no son esenciales para la lograr la RVS. Sin embargo, se ha comprobado que en la mayoría de casos, se produce una respuesta humoral rápida, que aunque no llega a eliminar la infección, reduce la aparición de fibrosis hepática.

Asimismo, los objetivos principales de la respuesta humoral son las proteínas E1 y E2 presentes en la envoltura viral. Convirtiéndose así en dos objetivos atractivos para el diseño de las vacunas. Hasta la fecha, el diseño de los anticuerpos neutralizantes viene centrado principalmente en E2 como diana terapéutica. Sobre todo, los estudios más potentes hasta la fecha, señalan como principales epítomos de E2 a los epítomos I, II y AR3 (región antigénica) (Figura 7).

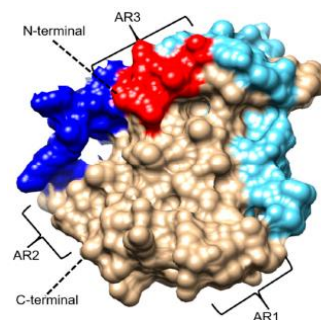


Figura 7: Diseño tridimensional de los epítomos de la proteína E2. Epítomo I marcado de color rojo y epítomo II marcado de azul oscuro (Duncan et al., 2020).

6.5.2. Limitaciones en el desarrollo de la vacuna

Sin embargo, a pesar de todas las investigaciones centradas en el desarrollo de una vacuna para combatir la hepatitis C, aún son muchos los retos que se presentan, ya que son múltiples las razones que exponen como un desafío el desarrollo de la misma:

La ARN polimerasa dependiente de ARN o fosfoproteína NS5b presenta una tasa de error elevada. Esto hace que, junto con los grandes niveles de producción del virus y la presión selectiva de la respuesta inmune del huésped, se promueva la diversificación del VHC: obteniendo ocho genotipos diferentes, que a su vez, se dividen en otros 86 subtipos conocidos hasta el momento.

1. Esto da lugar a respuestas inmunitarias específicas para cada genotipo, lo que dificulta significativamente el desarrollo de una vacuna.

La respuesta inmunitaria cruzada (reacción de un antígeno 2 y un anticuerpo que se generó por un antígeno anterior 1 diferente pero similar a este antígeno 2), podría ser un punto clave en la investigación, ya que se ha comprobado, por ejemplo, que en pacientes que superaron con éxito la infección por genotipo 3, se han notificado reacciones cruzadas genotípicas de células T específicas del genotipo 3 del VHC en la actividad frente a otros genotipos (Cox, 2020).

2. El virus es capaz de evadir la respuesta inmune del huésped evolucionando la enfermedad hacia la cronicidad. Esto lo consigue de varias formas:
 - Los epítomos dominantes como son HVR1 de la glucoproteína E2 son capaces de generar en el huésped anticuerpos no neutralizantes. Además, se cree que HVR1 actúa como un escudo de epítomos más conservados en el núcleo E2 que contienen residuos de unión a CD81, porque la eliminación de HVR1 aumenta la sensibilidad del virus a la neutralización.
 - La glicosilación de las proteínas de la envoltura también sería un mecanismo de enmascaramiento de los epítomos. Las glucoproteínas E1 y E2 presentan 4 y 11 puntos de glicosilación. La supresión de los puntos de glicosilación en E2 se ha comprobado que aumenta la susceptibilidad del VHC a los anticuerpos.
 - Un aumento de las lipoproteínas HDL en sangre también suponen una disminución en la unión de los anticuerpos a los epítomos, ya que aumenta la infectividad del virus, pero al hacer que la unión con los receptores sea más fuerte, disminuye el tiempo de permanencia de las partículas virales en el organismo infectado y, por tanto, disminuye el tiempo para que los anticuerpos se unan a su objetivo.

- Se ha comprobado que la apoliproteína E presente en el huésped podría enmascarar a los epítomos de E2 anulando la actividad de los anticuerpos.
 - La evasión de los anticuerpos también está asociada a la resistencia a las proteínas transmembrana del virus. Esta resistencia estaría inducida como consecuencia de la actividad de los interferones producidos durante la respuesta inmune innata (Kong et al., 2016).
3. Dificultad a la hora de encontrar pacientes: debido al elevado nivel de infecciones asintomáticas, es complicado encontrar pacientes en estadios iniciales de la infección.
 4. Escasez de sistemas de cultivo apropiados: Al ser un virus que solo infecta a chimpancés y humanos, se han desarrollado modelos *in vitro* e *in vivo*, pero todos presentan restricciones que dificultan el estudio.
 5. Carencia en la financiación: Al tener desarrollados múltiples AAD, son muchos los gobiernos que no consideran necesarias las investigaciones en el desarrollo de la vacuna, por lo que la financiación es escasa en este ámbito.

6.5.3. Prototipos de vacunas en desarrollo

Son varios los prototipos de vacunas para el VHC que se están desarrollando en la actualidad, destacamos las vacunas subunidad, partículas similares a virus, vectores virales, vacunas basadas en ADN y nanopartículas.

En fase preclínica encontramos a aquellos prototipos de vacunas a las cuales se les está estudiando aún sus propiedades toxicológicas y su respuesta inmune tanto *in vitro* como *in vivo*. A los prototipos que se encuentran en fase I se les está analizando su seguridad. Por último, aquellos prototipos que se encuentran en fase II se les está investigando qué dosis es la necesaria para producir la eficacia deseada. Un resumen de los prototipos de vacunas que vamos a analizar se encuentra en la figura 8.

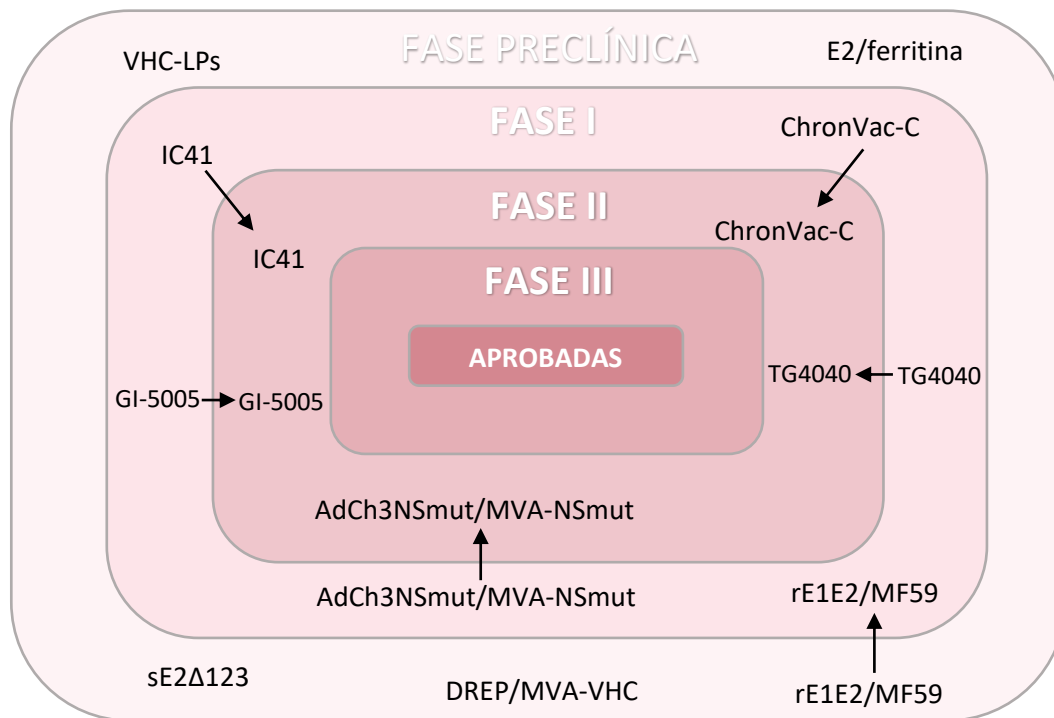


Figura 8: Prototipos de vacunas contra el VHC que están en fase preclínica, fase I o fase II de ensayos clínicos.

⇒ Vacunas de subunidades (contienen el agente infeccioso incompleto)

Las vacunas de subunidades o vacunas recombinantes son la primera opción en investigación debido a su económica producción a escala industrial. Además, su uso es conocido ya que se ha usado para numerosos patógenos como el virus de la gripe.

Los principales objetivos de la vacuna son las proteínas E1 y E2, por lo que el principal prototipo estudiado es la vacuna recombinante E1-E2 (rE1E2). Tras extraer la proteína recombinante de un genotipo 1A, se vacunó a siete chimpancés, dentro de los cuales cinco de ellos desarrollaron inmunidad esterilizante y los otros dos desarrollaron la enfermedad en fase aguda eliminándola posteriormente. Este modelo se validó aún más en animales pequeños en los que se comprobó que tras la administración de la vacuna, se podría producir una producción de anticuerpos por reactividad cruzada (Duncan et al., 2020).

Tras los alentadores resultados, se comenzó con los ensayos clínicos de fase I con pacientes sanos, administrando 4 gramos, 20 gramos y 100 gramos de rE1E2 con el coadyuvante MF59 (derivado de escualeno obtenido del hígado de tiburón que estimula el sistema inmunológico mediante la producción de células TCD4+). En dicha fase, además de demostrar que rE1E2 es seguro en humanos, se demostró que tras la administración del preparado, se inducía la respuesta inmune humoral y se producían anticuerpos

neutralizantes. Asimismo, en tres de los dieciséis voluntarios, también se inducía la producción de anticuerpos neutralizantes de reacción cruzada.

Igualmente, en el suero estudiado de los voluntarios se confirmó la presencia de anticuerpos neutralizantes AP33, IGH526, AR4A, AR5A y AR3B (anticuerpos monoclonales frente a las proteínas E1 y E2 del VHC). Sin embargo, se observó una respuesta inmune muy débil de las células T CD4+ frente a las glicoproteínas.

Para facilitar la producción de rE1E2 se intentó eliminar los dominios transmembranas de la proteína E pero esto se traducía en niveles bajos de producción de anticuerpos neutralizantes (Falade-Nwulia et al., 2017).

Otros diseños vacunales dirigidos a generar respuesta humoral y que han llegado a fase II son IC41, considerado un multiepitopo sintético pero no se observó suficiente eficacia en enfermos crónicos (Klade et al., 2008) y GI-5005, una proteína formada por la unión de Core-NS3. Este último candidato sí demostró resultados significativos, mejorando en un 10% la carga viral no detectable, mejorando la respuesta innata y aumentando la efectividad de las terapias tradicionales (Roohvand, Kossari, 2012).

Por otro lado, otra línea de investigación dentro de las vacunas de subunidades, se centra en estudiar un modelo basado en la modificación de la proteína E2. Si se suprimen las regiones hipervariables HVR1, HVR2 e igVR (región variable intergenotípica) se obtienen dos formas de expresión de la proteína E2 (sE Δ 123): de alto y de bajo peso molecular. La isoforma de alto peso molecular demostró mayores niveles de anticuerpos neutralizantes frente a los genotipos 2a, 4a, 5a, 6a y 7a. Asimismo, también daba lugar a una disminución de los anticuerpos no neutralizantes, por lo que la respuesta inmune humoral se centra más en los anticuerpos neutralizantes (Vietheer et al., 2017)

⇒ **Partículas similares al virus**

Esta prometedora estrategia de investigación se basa en obtener vacunas donde las partículas administradas no contendrían el ARN del virus pero sí estarían formadas por elementos de la superficie del VHC, estimulando así a la producción de elevadas cantidades de anticuerpos en el organismo. Se consideran vacunas muy inmunogénicas, pues consiguen una respuesta inmune elevada (Torresi, 2017).

Las VHC-LPs (*Virus-like particles* del VHC) fueron expresadas por primera vez en la línea celular del insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) que usó como vehículo (vector viral) un baculovirus recombinante en cuya estructura presentaba las glicoproteínas E1 y E2. Tras

la administración de cuatro dosis a cuatro chimpancés se observó la producción de células T CD4+ y células T CD8+ en los cuatro animales. Asimismo, tras la administración, se expuso a los chimpancés a la enfermedad natural, dando lugar a una viremia reducida en los chimpancés vacunados en comparación con los animales control (Elmowalid et al., 2007).

Recientemente, la investigación en este ámbito se ha expandido, modificando las líneas celulares utilizadas: Se ha cambiado la línea celular del insecto Sf9 por una línea celular de hepatoma humano (Huh7) utilizando como vehículo un adenovirus recombinante que expone las secuencias estructurales que representan los genotipos 1a, 1b, 2a y 3a para producir VHC-LPs con una conformación similar a las partículas virales de forma natural. Tras la administración de la vacuna cuadrivalente en ratones, se ha demostrado una producción de anticuerpos neutralizantes y una activación de células T CD4+ y células T CD8+. Estos resultados han sido extrapolados a cerdos recientemente, obteniendo también respuestas de anticuerpos neutralizantes (Christiansen et al., 2019).

⇒ **Vectores virales**

Esta línea de investigación basada en vectores virales ha demostrado inducir una respuesta inmune elevada. Los vectores virales con más interés terapéutico son el vector poxviral Virus Vaccinia Modificado de Ankara (*MVA - Modified Vaccinia Virus Ankara*), el adenovirus humano 6 (HuAd6) y los vectores de chimpancés Ad 3 (ChAd3).

Son varios los candidatos a vacunas que han conseguido llegar a fase II en ensayos en humanos: El primer ensayo clínico que llega a fase II se realizó en 548 pacientes de alto riesgo (usuarios de drogas intravenosas) y constaba de dos dosis: la primera dosis mediante el vector viral ChAd3 que expresaba las proteínas NS3, NS4 y NS5 del genotipo 1b (AdCh3NSmut1) y la segunda dosis, ocho semanas después, mediante MVA que expresaba las mismas proteínas (MVA-NSmut). Los resultados obtenidos indicaban una eficacia real de la vacuna frente a la exposición al VHC, ya que se producía un aumento de la actividad de los linfocitos T CD4+ y de los linfocitos T CD8+ hacia los epítomos de las proteínas no estructurales del virus. Sin embargo, aunque la vacuna demostró la eficacia en voluntarios sanos en fase I, fue en la fase II cuando se concluyó que no se podría usar como vacuna profiláctica ya que no pudo revertir el agotamiento de las células T en pacientes crónicos (Swadling et al., 2016).

Otro ensayo que llegó a fase II es TG4040. Este consistía en utilizar también el vector viral MVA que expresa las proteínas NS3, NS4 y NS5b del genotipo 1b del VHC. Los resultados obtenidos fueron positivos, ya que el 64,2% de los pacientes vacunados generaron una respuesta inmune celular específica y un descenso de la carga viral a niveles indetectables en comparación con los pacientes que solo recibieron tratamiento con AAD, que fue un 45,9% (Di Bisceglie et al., 2015).

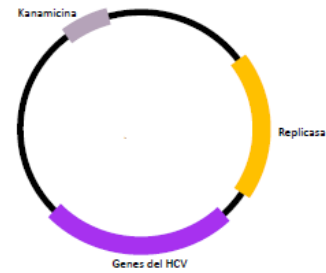


Figura 9: Estructura plásmido DREP (Quirós, 2019).

⇒ Vacunas basadas en ADN

Las vacunas de ADN consisten en un plásmido bacteriano que codifica el antígeno diana bajo el control de un promotor eucariota. En comparación con las vacunas de proteínas convencionales o recombinantes, tienen muchas ventajas, incluido el aislamiento y la posible producción a gran escala.

ChronVac-C® fue un plásmido que expresa las proteínas NS3 y NS4a del genotipo 1a que llegó a fase II. Sin embargo, tras dicha fase, se concluyó que no había suficientes diferencias entre los pacientes vacunados y no vacunados (Roohvand, Kossari, 2012).

⇒ Nanopartículas

Otra línea de investigación que sigue en fase preclínica son las nanopartículas. Se observó que una vacuna compuesta por proteína E2 soluble fusionada con una unidad de ferritina mejoraba ampliamente la producción de anticuerpos neutralizantes. Se obtenían así nanopartículas de ferritina que incluían en su superficie la proteína E2. El resto de la estructura de la nanopartícula era sencilla y mejoraba notablemente la afinidad por los receptores y los anticuerpos, en comparación con otras vacunas que contenían exclusivamente la proteína E2 sin ferritina. Esto supone una posibilidad de investigación en este ámbito (Yan et al., 2020).

⇒ Replicones

Un replicón es una secuencia de ADN con capacidad de replicación independiente ya que posee un origen de replicación propio. De esta forma, una línea de investigación es la utilización de plásmidos de ADN autoreplicativos denominados DREP (*DNA-launched self-amplifying RNA replicon*) usando como vector viral MVA (figura 9). Los denominados DREP una vez que transducen en las células estimulan a los PRRs y estos inducen la producción

de IFN-I desencadenando una apoptosis. Asimismo, se ha comprado que añadiendo un potenciador de la traducción a los DREP se puede optimizar su actividad. De esta forma, los DREP/MVA-VHC producirían mayores niveles de respuesta inmune específica en ratones comparación con las vacunas de ADN convencionales (Quirós, 2019).

En la siguiente tabla (tabla 5) se muestra un resumen de los principales prototipos de vacunas, que se han analizado anteriormente, de forma esquemática y concisa:

Tabla 5: Principales prototipos de vacunas en estudio (incluye diana terapéutica, genotipo y fase de ensayo clínico en que se encuentra)

PROTOTIPO DE VACUNA	DIANA TERAPÉUTICA	GENOTIPO	FASE DE ENSAYO CLÍNICO
VACUNAS DE SUBUNIDADES			
1. rE1E2/MF59	E1, E2	Genotipo 1a	Fase I (humanos)
2. sE2Δ123	E2 y core	Genotipos 2a, 4a, 5a, 6a y 7a	Fase preclínica (cerdos)
3. IC41	Multiepitopo	Genotipo 1	Fase II (humanos)
4. GI-5005	NS3 y core	Genotipo 1	Fase II (humanos)
VACUNAS CON PARTÍCULAS SIMILARES AL VIRUS			
1. VHC-LPs	E1, E2 y core	Genotipos 1a, 1b, 2a y 3a	Fase preclínica (ratones y cerdos)
VACUNAS BASADAS EN VECTORES VIRALES			
1. AdCh3NSmut/MVA-NSmut	NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b	Genotipo 1a	Fase II (humanos)
2. TG4040	NS3, NS4 y NS5b	Genotipo 1b	Fase II (humanos)
VACUNAS BASADAS EN ADN			
1. ChronVac-C	NS3 y NS4a	Genotipo 1a	Fase II (humanos)
VACUNAS BASADAS EN NANOPARTÍCULAS			
1. E2/ferritina	E2	Sin determinar	Fase preclínica (ratones)
VACUNAS BASADAS EN REPLICONES			
1. DREP/MVA-VHC	Hepatocitos	Sin determinar	Fase preclínica (ratones)

7. CONCLUSIONES

- I. El entendimiento de la morfología del virus de la hepatitis C, así como de la variación de su estructura durante el proceso de formación de las partículas virales, es esencial para conocer las dianas terapéuticas existentes así como para entender su capacidad para evadir la respuesta farmacológica o profiláctica de las vacunas.
- II. Los avances en el desarrollo de antivirales de acción directa, en concreto, aquellos con actividad genotípica, han supuesto un gran progreso en el tratamiento. Asimismo, tanto el diagnóstico precoz como la detección de pacientes asintomáticos, son cruciales para alcanzar el objetivo mundial propuesto por la Organización Mundial de la Salud basado en la erradicación de la hepatitis C para el año 2030.
- III. El desarrollo de la enfermedad así como el costo de los medicamentos dificultan, en ocasiones, un tratamiento precoz de la infección. Los fármacos antivirales suelen presentar un elevado precio al que no toda la población tiene acceso, ya sean usuarios de drogas intravenosas o pacientes procedentes de países menos desarrollados. Además, son numerosos los casos en los que los pacientes padecen la infección de manera asintomática, por lo que esto supondría un problema ya que son portadores y transmisores de la infección, pero no son detectados.
- IV. La investigación de nuevas dianas terapéuticas es importante para el desarrollo de nuevos fármacos que traten la enfermedad con mayor eficiencia, es decir, fármacos iguales o más efectivos que curen la enfermedad, pero con el menor coste posible, teniendo en cuenta los recursos económicos.
- V. El progreso en la obtención de una vacuna preventiva contra el virus de la hepatitis C también es uno de los puntos clave para llegar a conseguir el objetivo propuesto. La morfología del virus supone un desafío en su desarrollo, puesto que dificulta el avance de una vacuna realmente eficaz. No obstante, el conocimiento en profundidad del virus ha permitido establecer dianas terapéuticas que serán usadas en un futuro próximo en la obtención de alguna vacuna para la prevención de la hepatitis C.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Guadarrama AB, Rios MY. Flavonoids, Sterols and Lignans from *Cochlospermum Vitifolium* and Their Relationship with Its Liver Activity. *Molecules*. 2018; 23(8): 1952.
- Armijo JA, Adín J. Farmacología clínica: objetivos y metodología. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, editores. *Farmacología humana*. 4ª edición. Barcelona: Masson; 2003. 191-218.
- Ashworth Briggs EL, Gomes RGB, Elhoussein M, Collier W, Findlow IS, Khalid S et al. Interaction between the NS4B amphipathic helix, AH2, and charged lipid headgroups alters membrane morphology and AH2 oligomeric state: Implications for the Hepatitis C virus life cycle. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1848(8): 1671–1677.
- Asociación Española para el Estudio del Hígado. Guías AEEH/SEIMC de manejo de la hepatitis C. 2017 [en línea]. [Consultado en mayo de 2021]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gehep/dcientificos/documentos/gehep-dc-2017-ManejoHepatitisC-AEEHySEIMC-Marzo.pdf>
- Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis*. 2018; 218(11): 1722–1729.
- Boulant S, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, McLauchlan J. Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule - and dynein - dependent manner. *Traffic*. 2008; 9(8): 1268–1282.
- Carretero M. PEG-interferón: Tratamiento de la hepatitis c crónica. *Offarm*. 2006; 25(3): 116-118.
- Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia epidemiológica de la Hepatitis C en España, 2019. Madrid, octubre 2020. Disponible en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Hepatitis%20C/Vigilancia_HepatitisC_2019.pdf
- Christiansen D, Earnest-Silveira L, Grubor-Bauk B, Wijesundara DK, Boo I, Ramsland PA, et al. Pre-clinical evaluation of a quadrivalent HCV VLP vaccine in pigs following microneedle delivery. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 9251.
- Collier L, Oxford L, Pipkin J, Domínguez A, Fernández Presas AM. *Virología humana: Texto para estudiantes de medicina, odontología y microbiología*. 3ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 2008.
- Cox AL. Challenges and Promise of a Hepatitis C Virus Vaccine. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020; 10(2).
- Duncan JD, Urbanowicz RA, Tarr AW, Ball JK. Hepatitis C Virus Vaccine: Challenges and Prospects. *Vaccines*. 2020; 8(1): 90.
- Dentzer TG, Lorenz IC, Evans MJ, Rice CM. Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol*. 2009; 83(24): 12702–12713.
- Di Bisceglie AM, Janczweska-Kazek E, Habersetzer F, Mazur W, Stanciu C, Carreno V, et al. Efficacy of immunotherapy with TG4040, peg-interferon, and ribavirin in a Phase 2 study of patients with chronic HCV infection. *Gastroenterology*. 2014; 147(1): 119-131.
- Elmowalid GA, Qiao M, Jeong S-H, Borg BB, Baumert TF, Sapp RK, et al. Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(20): 8427–8432.

- Falade-Nwulia O, Suarez-Cuervo C, Nelson DR, Fried MW, Segal JB, Sulkowski MS. Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med.* 2017; 166(9): 637–648.
- Freedman H, Logan MR, Law JLM, Houghton M. Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infect Dis.* 2016; 2(11): 749-762.
- Gao M, O’Boyle DR 2nd, Roberts S. HCV NS5A replication complex inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2016; 30: 151–157.
- García Deltoro M, Ricart Olmos C. Hepatitis C virus infection and new treatment strategies. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019; 37 (1): 15–19
- Goffard A, Dubuisson J. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie.* 2003; 85(3–4): 295–301.
- Griffin SDC, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 2003; 535(1–3): 34–38.
- Hedskog C, Parhy B, Chang S, Zeuzem S, Moreno C, Shafran SD, et al. Identification of 19 Novel Hepatitis C Virus Subtypes-Further Expanding HCV Classification. *Open forum Infect Dis.* 2019; 6(3): ofz076.
- Houghton M. Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int.* 2009; 29 (1): 82–88.
- Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, et al. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *Plos Pathog.* 2010; 6(12): e1001233.
- Khaliq S, Jahan S, Hassan S. Hepatitis C virus p7: Molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potential antiviral target. *Liver Int.* 2011; 31(5): 606–617.
- Klade CS, Wedemeyer H, Berg T, Hinrichsen H, Cholewinska G, Zeuzem S, et al. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology.* 2008; 134(5): 1385–1395.
- Kong L, Giang E, Nieuwsma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, et al. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science.* 2013; 342(6162): 1090–1094.
- Kong L, Lee DE, Kadam RU, Liu T, Giang E, Nieuwsma T, et al. Structural flexibility at a major conserved antibody target on hepatitis C virus E2 antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113(45): 12768–12773.
- Koutsoudakis G, Fornis X, Pérez-del-Pulgar S. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol.* 2013; 36(4): 280-293.
- Lambert SM, Langley DR, Garnett JA, Angell R, Hedgethorpe K, Meanwell NA, et al. The crystal structure of NS5A domain 1 from genotype 1a reveals new clues to the mechanism of action for dimeric HCV inhibitors. *Protein Sci.* 2014; 23(6): 723–734.
- Li G, De Clercq E. Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Res.* 2017; 142: 83–122.
- Lozano Mérida JA. Hepatitis C crónica. Vías de transmisión, diagnóstico, clínica y tratamiento. *Offarm.* 2004; 23(3): 104-109.
- JM, Shanmugam S, Singh SM, Lemon SM, et al. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol.* 2011; 85(1): 86–97.

- Ma Y., Anantpadma M., Timpe JM., Shanmugam S., Singh SM., Lemon SM. et al. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol.* 2011; 85(1):86-97.
- Madan V, Bartenschlager R. Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin. *Viruses.* 2015; 7(8): 4461–4481.
- Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet.* 2008; 372(9635): 321–332.
- Mahmoudabadi G, Phillips R. A comprehensive and quantitative exploration of thousands of viral genomes. *Elife.* 2018; 7: e31955.
- Martinez MA, Franco S. Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity. *Viruses.* 2020; 13(1): 41.
- Martínez-Rebollar M, Larrousse M, Calvo M, Muñoz A, González A, Loncà M, et al. Current status of acute hepatitis C. *Elsevier España.* 2011; 29(3): 210-215.
- McConnell M, Lim JK. Hepatitis C Vaccine Development in the Era of Direct-Acting Antivirals. *Clin liver Dis.* 2018; 12(5): 118–121.
- Monrroy H, López-Lastra M, Soza A. Hepatitis C virus may have an entero-hepatic cycle which could be blocked with ezetimibe. *Med Hypotheses.* 2017; 102: 51–55.
- Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J Hepatol.* 2018; 10(2): 186–212.
- Nasir A, Romero-Severson E, Claverie J-M. Investigating the Concept and Origin of Viruses. *Trends Microbiol.* 2020; 28(12): 959–967.
- Nobel Media AB. The Nobel Prize. Press release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2020. 2020 [en línea]. [Consultado en marzo 2021]. Disponible en: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2020/press-release/>
- Popescu C-I, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, et al. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *Plos Pathog.* 2011; 7(2): e1001278.
- Prigozhin DM, Modis Y. Flunarizine arrests hepatitis C virus membrane fusion. *Hepatology.* 2016; 63(1): 14-16.
- Quirós. Aumento de la inmunogenicidad de una vacuna contra la hepatitis c (MVA-HCV) basada en el Virus Vaccinia Modificado de Ankara (MVA). Madrid: Tesis Doctoral del Centro Nacional de Biotecnología. 2019.
- Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Bazzi AM, Alfouzan WA, Alsuliman SA, Aldrazi FA, et al. Overview of hepatitis C infection, molecular biology, and new treatment. *J Infect Public Health.* 2020; 13(5): 773–783.
- Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. *Expert Opin Ther Pat.* 2012; 22(4): 391–415.
- Rosen HR. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2011; 364(25): 2429–2438.
- Rowe IA, Tully DC, Armstrong MJ, Parker R, Guo K, Barton D, et al. Effect of scavenger receptor class B type I antagonist ITX5061 in patients with hepatitis C virus infection undergoing liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2016; 22(3): 287–97.
- Salam KA, Akimitsu N. Hepatitis C virus NS3 inhibitors: current and future perspectives. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 467869.
- Shors T., *Virus: Estudio molecular con orientación clínica.* 1ª ed. Madrid: Panamericana, 2009.

- Swadling L, Halliday J, Kelly C, Brown A, Capone S, Ansari MA, et al. Highly-Immunogenic Virally-Vectored T-cell Vaccines Cannot Overcome Subversion of the T-cell Response by HCV during Chronic Infection. *Vaccines*. 2016; 4(3): 27.
- Tawar RG, Heydmann L, Bach C, Schüttrumpf J, Chavan S, King BJ, et al. Broad neutralization of hepatitis C virus-resistant variants by Civacir hepatitis C immunoglobulin. *Hepatology*. 2016; 64(5): 1495–1506.
- Torresi J. The Rationale for a Preventative HCV Virus-Like Particle (VLP) Vaccine. *Front Microbiol*. 2017; 8: 2163.
- Viethier PT, Boo I, Gu J, McCaffrey K, Edwards S, Owczarek C, et al. The core domain of hepatitis C virus glycoprotein E2 generates potent cross-neutralizing antibodies in guinea pigs. *Hepatology*. 2017; 65(4): 1117–1131.
- World Health Organization. ¿Qué es la hepatitis? 2014 [en línea]. [Consultado en marzo 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/features/qa/76/es/>
- Yan Y, Wang X, Lou P, Hu Z, Qu P, Li D, et al. A Nanoparticle-Based Hepatitis C Virus Vaccine With Enhanced Potency. *J Infect Dis*. 2020; 221(8): 1304–1314.
- Yost SA, Wang Y, Marcotrigiano J. Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins: A Balancing Act of Order and Disorder. *Front Immunol*. 2018; 9: 1917.