

TRABAJO FIN DE GRADO

QUIMIOTERAPIA DE LA

HEPATITIS

C



CRISTIAN RANGEL NÚÑEZ







UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA

*Trabajo Fin de Grado. Revisión Bibliográfica.*

# Quimioterapia de la Hepatitis C

AUTOR

**CRISTIAN RANGEL NÚÑEZ**

TUTORES

**MANUEL BUENO MARTÍNEZ  
INMACULADA MOLINA PINILLA**

ÁREA

**QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA**

PRESENTACIÓN

**6 DE JULIO DE 2017  
AULA 2.3  
FACULTAD DE FARMACIA**

GRADO EN  
FARMACIA



## 1. RESUMEN

La Hepatitis C es una enfermedad global provocada por el virus del mismo nombre. Afecta a 180 millones de personas aproximadamente. La gravedad de la enfermedad puede ir desde una dolencia leve con remisión espontánea hasta una enfermedad mortal que, en estados tardíos, llega a provocar cirrosis y carcinoma hepático, pudiendo dar lugar al deceso del afectado. Este contexto ha catalizado el avance en el conocimiento del virus, principalmente de su maquinaria proteica compuesta por diez proteínas de dos tipos: tres proteínas estructurales, que se encargan de la formación de la partícula viral y siete no estructurales, relacionadas con el proceso de replicación entre las que destacan NS3/4A, NS5A y NS5B. Además, el conocimiento del desarrollo del ciclo de vida del virus en el hospedador ha permitido identificar las etapas claves, las estrategias que el virus sigue para evadir la respuesta del hospedador, como la generación de una red membranosa que protege los intermedios de replicación viral de la respuesta inmune. Estos avances han llevado al diseño de nuevos antivirales de acción directa que inhiben a ciertas proteínas no estructurales. Aprobados a partir de 2014, estos principios activos han permitido lograr la curación de la enfermedad en casi la totalidad de los casos. Sin embargo, los costes de los tratamientos con dichos antivirales de acción directa han estado en tela de juicio por su elevado coste. En este trabajo se discute la inclusión de los medicamentos usados en el tratamiento de la Hepatitis C, centrándose en el de mayor relevancia clínica e industrial, y se analizan las ventajas aportadas. Además, se presentan aproximaciones a sus estrategias de síntesis química y se trata de comprender el diseño de los fármacos líderes en el tratamiento de la Hepatitis C, así como las perspectivas futuras.

**Palabras clave:** Ledipasvir · Sofosbuvir · Hepatitis C · AAD · Síntesis



## 2. ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Índice</b>	<b>3</b>
<b>A1. Anexo I: Abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>A2. Anexo II: Glosario de Términos</b>	<b>7</b>
<b>3. Introducción</b>	<b>9</b>
3.1. Definiciones	9
3.1.1. Quimioterapia	9
3.1.2. Hepatitis C	9
3.1.2.1. Hepatitis C aguda	9
3.1.2.2. Hepatitis C crónica	9
3.2. Antecedentes Generales	9
3.3. Epidemiología	10
3.3.1. Prevalencia y distribución	10
3.3.2. Factores de Riesgo	10
3.3.3. Historia Natural	10
3.4. Justificación del estudio	11
<b>4. Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>5. Metodología</b>	<b>15</b>
<b>6. Resultados y Discusión</b>	<b>17</b>
6.1. Virología	17
6.1.1. Proteínas estructurales	17
6.1.1.1. Core	17
6.1.1.2. Proteínas de envoltura	18
6.1.1.3. p7	19
6.1.2. Proteínas no estructurales	19
6.1.2.1. NS2	19
6.1.2.2. Complejo NS3-4A	19
6.1.2.3. NS4B	20
6.1.2.4. NS5A	20
6.1.2.5. NS5B	21
6.1.3. Ciclo de vida	21
6.1.3.1. Entrada, translación y procesamiento	21
6.1.3.2. Replicación	22
6.1.3.3. Ensamblaje y liberación	22
6.2. Quimioterapia	22
6.2.1. Sofosbuvir	25
6.2.1.1. Diseño de Sofosbuvir	26
6.2.1.2. Síntesis del nucleósido mediante fluoración temprana	26
6.2.1.3. Síntesis del bloque fosforamidato	27
6.2.1.4. Fosforamidación del nucleósido	28
6.2.2. Ledipasvir	29
6.2.2.1. Síntesis del bloque azaspiroheptano mediante resolución clásica	30
6.2.2.2. Preparación del bloque fluoreno para unión con bloques adyacentes	31
6.2.2.3. Síntesis del bloque azabicicloheptano y grupo benzoimidazol	31
6.2.2.4. Unión de los bloques	32
<b>7. Conclusiones</b>	<b>35</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>37</b>





## ANEXO I | Abreviaturas

aa	Aminoácido
AAD	Antiviral de acción directa
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
E1	<i>Envelopment Protein 1</i>
E2	<i>Envelopment Protein 2</i>
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida
HCA	Hepatitis C aguda
HCC	Hepatitis C crónica
HVR	Región Hipervariable
iNS3	Inhibidor de NS3
LCS	Secuencias de baja complejidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LiHMDS	Bis(trimetilsilil)amiduro de litio
MsCl	Cloruro de metanosulfonilo
MW	Red membranosa
NFSI	<i>N</i> -fluorobencenosulfonimida
NS	No estructural
NTP	Nucleótido Trifosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
PEG-INF $\alpha$	Interferón $\alpha$ pegilado
RE	Retículo Endoplasmático
rt	Temperatura ambiente
SNS	Sistema Nacional de Salud
SP	Signal Peptidase
SPP	Signal Peptide Peptidase
SVR	Respuesta Viral Sostenida
SVR	Respuesta viral Sostenida
TBME	<i>tert</i> -Butil metil éter
TEMPO	(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)óxido
THF	Tetrahidrofurano
VHC	Virus de la Hepatitis C
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad



## ANEXO II | Glosario de términos

<b>Agente etiológico</b>	Entidad física, química o biológica que puede producir una enfermedad en un organismo.
<b>Anfipático</b>	Moléculas que poseen un extremo hidrofílico soluble en agua y otro hidrófobo que es insoluble el agua.
<b>Anictérico</b>	Ausencia de coloración amarillenta de la piel y mucosas por un incremento de la bilirrubina sérica.
<b>Asintomático</b>	No presenta síntomas relacionados con la enfermedad.
<b>Cofactor</b>	Sustancia que ayuda a una enzima a catalizar una reacción.
<b>Conformación</b>	Forma que adquiere una proteína.
<b>Hidrofóbico</b>	Compuesto incapaz de disolverse en agua.
<b>Incidencia</b>	Número de nuevos casos diagnosticados en un periodo de tiempo.
<b>Naïve</b>	Paciente que no ha sido tratado anteriormente para una enfermedad en concreto.
<b>Percutánea</b>	Practicada por la piel o a través de la piel.
<b>Prevalencia</b>	Proporción de individuos de un grupo que presentan una característica o evento en un momento o en un periodo determinado.
<b>Proteasa</b>	Enzima con capacidad de catalizar roturas de enlaces peptídicos.
<b>Subclínica</b>	Enfermedad, trastorno o alteración que carece de manifestaciones clínicas evidentes.



## **3. INTRODUCCIÓN**

### **3.1. Definiciones**

#### **3.1.1. Quimioterapia**

Comúnmente, la palabra quimioterapia está asociada de manera implícita a lo oncológico, pero se trata de un término mucho más amplio. La Real Academia de la Lengua Española define este término como “tratamiento de las enfermedades por medio de productos químicos”.

#### **3.1.2. Hepatitis C**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la Hepatitis C como la enfermedad del hígado causada por el virus de la Hepatitis C (VHC), transmitido por la sangre, el cual puede causar una infección tanto aguda como crónica y cuya gravedad varía entre una dolencia leve que dura algunas semanas y una enfermedad grave de por vida, siendo la primera causa de trasplante hepático.

##### **3.1.2.1. Hepatitis C aguda (HCA)**

La forma aguda de esta enfermedad es subclínica, y por tanto leve. Es más común en adultos de edades comprendidas entre los 20 y los 39 años, con una ligera predominancia en hombres. Al tratarse de un desarrollo asintomático y anictérico, habitualmente no se diagnostica (Davis et al., 2004) ya que la infección remite en un plazo de 6 meses sin necesidad de tratamiento alguno. Si esta remisión no se da, la enfermedad se cronifica y se hablaría de Hepatitis C crónica que sí requiere tratamiento y es objeto de este estudio.

##### **3.1.2.2. Hepatitis C crónica (HCC)**

Entre el 55% y el 85% de los infectados por el VHC desarrollan HCC. Es la forma de la enfermedad en la que se presentan los síntomas, por lo que no se trata de una enfermedad subclínica, como es el caso de la HCA. Además, se relaciona con la aparición de complicaciones como fibrosis hepática, cirrosis, hipertensión portal o carcinoma hepatocelular, desarrollándose dichas complicaciones de forma lenta (Davis et al., 2010), produciendo en torno a 350.000 muertes cada año (Hannafiah et al., 2013).

### **3.2. Antecedentes Generales**

La transmisión por vía percutánea de la ‘enfermedad icterica’ fue descubierta en el último lustro de la década de 1880 con la introducción de la vacuna de la viruela, pero no fue hasta 1943 cuando se asociaron las transfusiones sanguíneas con la hepatitis. El agente etiológico de la infección fue un misterio hasta que en 1967 se descubrió el antígeno de la hepatitis B, que estaba asociado a sólo algunos casos. Lo mismo ocurrió con el antígeno de la hepatitis A, descubierto en 1973.

Pese al descubrimiento de dos tipos de hepatitis infecciosas, la mayoría de las hepatitis infecciosas parecían no tener un agente etiológico claro. En un principio se le llamó virus no-A

no-B, hasta que en 1989 científicos japoneses y estadounidenses identificaron al causante de la mayor parte de las hepatitis transmitidas por vía parenteral y le llamaron VHC (Davis, 2012; Douam et al., 2016).

### **3.3. Epidemiología**

#### **3.3.1. Prevalencia y distribución**

Aunque la incidencia de la infección ha disminuido, se estima que más de 185 millones de personas están infectadas por el VHC, lo que equivale aproximadamente a un 2.8% de la población mundial (Mohd et al., 2013), estando la mayoría de los portadores del VHC sin diagnosticar (Kwong, 2014).

La distribución geográfica del VHC no es homogénea. Se estima que Estados Unidos, Canadá, y Brasil están entre los países con menor seroprevalencia del antígeno anti-VHC, siendo esta menor al 1.5%. En Europa, Rusia y Sudamérica (sin incluir a Brasil) es moderada encontrándose en estos países la seroprevalencia anti-VHC entre 1.5 – 3.5%. En España es de 1.2% (Gower et al., 2014). Finalmente, los países en los que se da una prevalencia superior al 3.5% son los del Norte de África, Oriente Medio, China, Kazajistán y Mongolia (Hanafiah, 2013).

Tampoco se distribuye de igual manera por edades, ya que en todas las poblaciones estudiadas existe una mayor seroprevalencia del anticuerpo anti-VHC entre los nacidos entre 1940 y 1950 (Hanafiah, 2013).

Respecto a la distribución genotípica del virus, cabe destacar que casi la mitad de las infecciones por VHC a nivel mundial son producidas por el genotipo 1 (Lawitz et al., 2017).

#### **3.3.2. Factores de riesgo**

Los factores de riesgo están estrechamente relacionados con las vías de transmisión del VHC, que se transmite por vía parenteral, exposición percutánea o de mucosas a sangre y hemoderivados infectados, vinculándose la transmisión con (1) el consumo de drogas inyectables, (2) transfusiones de sangre y hemoderivados, así como trasplantes de órganos que se realicen sin la previa detección sistemática del virus, (3) la reutilización de equipo médico, especialmente agujas y jeringuillas, (4) incumplimiento de las normas generales de higiene por parte del personal sanitario, lo que produce infecciones nosocomiales, (5) accidentes biológicos y (6) tatuajes y piercings (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2015).

#### **3.3.3. Historia natural**

La progresión de la enfermedad tras la infección aguda no es azarosa, sino que depende de numerosos factores como el uso de drogas, alcohol, obesidad, esteatosis, edad, factores genéticos

y coinfección con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), que incrementan la probabilidad de progresión.

La progresión de la enfermedad se clasifica según la velocidad de ésta. Si se desarrolla cirrosis entre 5 y 10 años después del diagnóstico, se denomina de progresión rápida. Si transcurren entre 11 y 30 años, se trata de una progresión media, y si la progresión dura más de 30 años, se denomina lenta.

El VHC produce cirrosis entre el 15-30% de los infectados, que deriva en cirrosis descompensada y en carcinoma hepatocelular (World Health Organization, 2014), relacionándose estas dos últimas complicaciones con el 90% de la mortalidad atribuible al VHC (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2015).

### **3.4. Justificación del estudio**

El tratamiento clásico estándar de la HCC consistía en la auto-administración de Interferón  $\alpha$  Pegilado (PEG-INF $\alpha$ ), semanalmente por vía subcutánea, más entre 6 y 9 cápsulas de Ribavirina por vía oral, diariamente. Este tratamiento fue comúnmente conocido como *doble terapia*. Para la evaluación del éxito de los tratamientos, entra en juego un parámetro esencial, conocido por *Sustained Virological Response* (SVR), que indica el porcentaje de los pacientes infectados cuya carga viral permanece indetectable a las 24 semanas de finalizar el tratamiento. En el caso de la *doble terapia*, este parámetro oscilaba entre el 40-50% para los pacientes con genotipo 1, y entre el 70-80% de los pacientes con genotipos 2 y 3 (European Association for the Study of the Liver, 2016).

Se trata, sin duda, de números para nada deleznales, pero que presentaban ciertos inconvenientes que se enumeran a continuación:

- a) Numerosas y exacerbantes reacciones adversas (RAM) tanto por parte del PEG-INF $\alpha$  como por parte de la Ribavirina. Las más relevantes son:
  1. Ribavirina: efecto carcinogénico y anemia.
  2. PEG-INF $\alpha$ : desequilibrios psiquiátricos; anormalidades en la función tiroidea; infarto de miocardio; hipertensión; trastornos autoinmunes (entre los que se incluye psoriasis); síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada; síndrome pseudogripal; sepsis; disnea o edema pulmonar (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2016).
- b) Utilidad sólo frente a genotipos 1, 2 y 3.
- c) Fracaso terapéutico que podía llegar hasta el 60% en algunos casos.

La aprobación e introducción en el mercado farmacéutico en 2011 de los ahora obsoletos inhibidores de la proteasa NS3 (iNS3) de primera generación por la *European Medicines Agency* (EMA): Boceprevir y Telaprevir, tampoco supuso una revolución ni un giro drástico en la forma de tratar la HCC, pues se sumaban a la *doble terapia*, generando una terapia triple, que incrementaba la SVR entre un 20-50%, pero que añadía a las RAM existentes un conjunto de RAM aún más hoscas, como exantema que en ocasiones llegaba a ser grave, o prolongación del intervalo QT. También traían consigo numerosas interacciones farmacológicas, las más relevantes se daban en el campo del trasplante hepático al modificar los niveles de fármacos inmunosupresores, pero también interaccionaban con fármacos de común uso, como las estatinas, benzodiazepinas, Digoxina o Etinilestradiol (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2017; European Association for the Study of the Liver, 2015).

En 2014, la EMA autorizó la comercialización de un iNS3 de segunda generación con mejor perfil de seguridad y farmacocinético, que además era efectivo frente a los genotipos 1 y 4, llamado Simeprevir (Olysio<sup>®</sup>), que en *triple terapia*, alcanzó una SVR en torno al 80% (Arenas Ruiz-Tapiador et al., 2014).

La revolución la trajo consigo un nuevo fármaco: Sofosbuvir (Sovaldi<sup>®</sup>), que presentó tres importantes novedades: (1) Actividad pangnotípica, es decir, utilidad frente a todos los genotipos del VHC; (2) permitió por primera vez un tratamiento libre de interferón con una SVR entre el 63-78% y (3) en *triple terapia* alcanzó una SVR de hasta el 95% (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2017). También presentó un inconveniente de índole económica que hizo correr ríos de tinta y abocó a los afectados a las calles: su precio, según el diario ABC era de 60.000 euros por tratamiento en Europa.

El conocimiento de la maquinaria molecular del VHC junto con la introducción de novedosas técnicas en el campo de la Química Farmacéutica han permitido el desarrollo de nuevos fármacos, que combinados, no sólo alcanzan el éxito terapéutico en casi la totalidad de los casos, sino que también ofrecen muy pocas RAM y han permitido terapias libres de PEG-INF $\alpha$  e incluso de Ribavirina.

Es en estos nuevos fármacos, en lo que se centrará este estudio, intentando averiguar los puntos clave de su síntesis química, así como sus implicaciones tanto clínicas como fármaco-económicas.



## 4. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado ha comenzado con una minuciosa revisión bibliográfica con el fin de conocer de manera exhaustiva en qué momento del tratamiento de la Hepatitis C nos encontramos. En la presente memoria se proponen los siguiente objetivos: (1) Análisis de la estructura y función de la maquinaria proteica del Virus de la Hepatitis C, pues cualquier Antiviral de Acción Directa tiene como diana terapéutica una de las proteínas del virus de la Hepatitis C; (2) Estudio del ciclo de vida que el virus desarrolla con el fin de entender los puntos clave y de qué manera se podría ‘desarmar’ al virus de la Hepatitis C; (3) Análisis de la forma de tratar la Hepatitis C en España, haciendo una comparativa entre dos Guías Clínicas que nos atañen: la *European Association for Study of the Liver Recommendation on Hepatitis C 2016* a nivel Europeo, y el Plan Estratégico del Sistema Nacional de Salud para el abordaje de la Hepatitis C, considerando las diferencias entre ellas y (4) se identificará el medicamento para la Hepatitis C que lidera el mercado farmacéutico español mediante un análisis farmacoeconómico y químico para a continuación examinar su diseño y proponer aproximaciones a su síntesis.

Por último, y en base a todo lo expuesto en este trabajo, se razonarán las perspectivas futuras en el tratamiento de la Hepatitis C.



## 5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado, se comenzó con el diseño de un título atractivo. En el diseño de este título nos encontramos con un pequeño hándicap: muchos de los fármacos de los que aquí se hablan se encontraban aún en experimentación y no se conocía exactamente el impacto clínico que iban a tener, por lo que se optó por la palabra ‘Quimioterapia’ como palabra que abarca a todos los fármacos usados en el tratamiento de la Hepatitis C excepto al PEG-INF $\alpha$  y que llama la atención del lector.

A continuación, se establecieron las tres líneas de investigación que se iban a seguir para el desarrollo de este trabajo: La primera línea versaría sobre la epidemiología de la Enfermedad, y se trata en la Introducción, apartado 3 de la presente Memoria. La segunda línea trataría la virología, haciendo hincapié en las proteínas virales y su función en el ciclo vital del VHC, que se revisa en Resultados y Discusión, apartado 6.1 “Virología”. La tercera línea versaría sobre el tratamiento con AAD de la Hepatitis C, identificando los principios activos con más relevancia clínica, investigando sobre el desarrollo de dichos fármacos, proponiendo aproximaciones sintéticas de los principios activos tratados. Esta tercera línea se desarrolla dentro de Resultados y Discusión, apartado 6.2. “Quimioterapia”.

Para llevar a cabo la investigación bibliográfica, se consultaron dos bases de datos: PubMed para la búsqueda bibliográfica de contenidos clínicos, bioquímicos y biológicos. SciFinder<sup>®</sup> fue utilizada para búsquedas relacionadas con contenidos químicos. Se estudió la bibliografía más reciente sobre los aspectos tratados en cada sección y se identificó a los autores más relevantes de cada campo. Una vez identificados dichos autores, se indagó sobre sus publicaciones relacionadas con los temas que eran de interés en este estudio.

Los costes de los tratamientos por paciente se extrajeron de informes facilitados por facultativos de la Unidad de Gestión Clínica de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario Virgen Macarena, y las reacciones adversas así como las indicaciones y algunas SVR fueron extraídas de Fichas Técnicas de los medicamentos, obtenidas mediante el Centro de Información Online del Medicamento de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.

Finalmente, para el desarrollo de los esquemas sintéticos y diseño de figuras y fórmulas químicas, se utilizó el programa ChemDraw Professional 15.0.

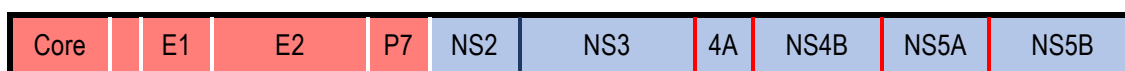


## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Virología

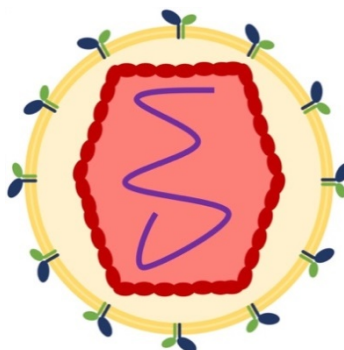
El VHC es un virus de ácido ribonucleico (ARN) que pertenece a la familia *Flaviviridae*, del género *Hepacivirus*, del que se conocen 7 genotipos y 67 subtipos distintos confirmados más otros 20 subtipos provisionales (Smith et al., 2014).

Presenta una cadena única de ARN en sentido positivo de 9.6 kilobases. Su genoma contiene un único marco abierto de lectura (ORF, de *Open Reading Frame*) que codifica a una poliproteína que contiene entre 3010 y 3030 residuos aminoacídicos (aa) (Falcón et al., 2017). Dicha poliproteína presenta dos tipos de proteína: estructurales (relacionadas con el ensamblaje) y no estructurales (relacionadas con la replicación) (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de la organización de la poliproteína del VHC. Coloreada de rojo se muestran las proteínas estructurales, relacionadas con la estructura del virus. De azul, se muestran las no estructurales (NS), relacionadas con el proceso de replicación. Las uniones cuyas escisiones están catalizadas por las proteasas del hospedador se muestran en blanco, las escisiones catalizadas por NS2, en azul, y las catalizadas por NS3 en rojo.

El ARN se presenta protegido por una nucleocápsida y una envuelta lipídica en la que se encuentran insertas las proteínas de envoltura (Figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática del VHC. En azul se representa la proteína de envoltura E1. En verde la proteína de envoltura E2. En amarillo, la bicapa lipídica que forma la envoltura. De rojo, la proteína Core que forma la cápsida, y dentro de ésta, en morado, se representa el ARN.

#### 6.1.1. Proteínas estructurales

##### 6.1.1.1. Core

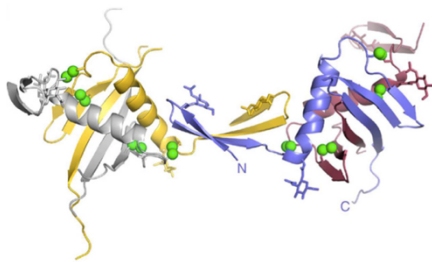
La primera proteína codificada por el ORF del VHC es la proteína *Core* (Figura 1), encargada de formar la nucleocápsida. *Core* es liberada de la poliproteína gracias a la escisión producida por

la proteasa humana Signal Peptidase (SP), que libera una proteína inmadura de 191 aa y se dirige al retículo endoplasmático (RE), donde la Signal Peptide Peptidase (SPP) la convierte en una proteína madura, dimérica y estabilizada por enlaces disulfuro con aproximadamente 177 aa (Oeher et al., 2012) formada por dos  $\alpha$ -hélices anfipáticas conectadas por un tirabuzón hidrofóbico.

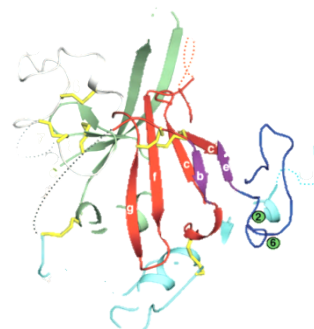
#### 6.1.1.2. Proteínas de envoltura

Las Proteínas de Envoltura 1 y 2 (E1 y E2) se encuentran incrustadas en una capa lipídica que envuelve al ARN viral (Figura 2), y desempeñan un papel determinante en el ciclo de vida del VHC. Sus funciones están relacionadas con la entrada viral, la fusión y la secreción de las partículas virales (Freedman et al., 2016). Para cumplir dichas funciones, E1 y E2 (Figuras 3 y 4, respectivamente) adquieren diferentes conformaciones que deben estar estrechamente controladas para que se den en el momento apropiado del ciclo de vida viral (Moradpour y Penin, 2013).

Se tratan de proteínas que suscitan un elevado interés en investigación por su potencial uso en la formulación de futuras vacunas, así como en el desarrollo de nuevos antivirales. Especialmente en el caso de E2, se han descubierto hasta el momento dos sitios que pueden ser de gran utilidad como dianas terapéuticas. La estructura de E2 presenta dos estratos: el estrato delantero y el estrato trasero. El punto de unión de estos dos estratos actúa como sitio de unión al receptor CD81. Además, E2 cuenta también con numerosas regiones hipervariables (HVR) que aportan diversidad en la secuencia que ayuda al VHC a desarrollar la evasión inmune (Freedman et al., 2016), lo que complica la labor científica a la hora de desarrollar vacunas.



**Figura 3.** Representación esquemática de E1. Los monómeros han sido representados de forma diferente (gris, amarillo, rojo y azul). Los puntos verdes representan los puentes disulfuro (Freedman et al., 2016).



**Figura 4.** Representación esquemática de E2. El estrato delantero se presenta de color cian, mientras que el estrato trasero está coloreado de verde. El sitio de unión a CD81 es de color azul (Kong et al., 2013).

### 6.1.1.3. p7

Es una proteína de 63 aa compuesta por dos  $\alpha$ -hélices transmembrana conectadas por un tirabuzón citoplasmático, formando hexámeros o heptámeros. Pertenece a la familia de las viroporinas, y aunque su función no se conoce exactamente, sí se sabe que, tanto *in vivo* como *in vitro* es esencial para el ensamblaje del virus.

Actualmente se está incrementando el número de evidencias que sugieren que *p7* resulta crítica en funciones sin relación con su actividad de poro. Una posibilidad es que *p7* actúe suprimiendo la acidificación de orgánulos celulares, protegiendo así a los viriones nacientes de cambios conformacionales prematuros inducidos por ácidos (Moradpour y Penin, 2013), aunque hasta la fecha todo son suposiciones.

## 6.1.2. Proteínas no estructurales (NS)

### 6.1.2.1. NS2

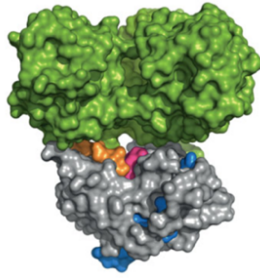
Esta proteína no es indispensable *per se*, pero es la encargada de liberar la unión NS2/NS3 de la poliproteína, donde NS3 sí es indispensable para promover el proceso de replicación del ARN.

### 6.1.2.2. Complejo NS3-4A

NS3-4A es un complejo no covalente compuesto por NS3 (una proteína multifuncional de 631 aa) y el cofactor NS4A (Figura 5). Por un lado, NS3 presenta actividad serina proteasa localizada en el tercio *N*-terminal, que corresponde con los aminoácidos comprendidos entre el aa 1 y el 180.

Por otra parte, en los dos tercios *C*-terminal presenta actividad NTPasa/ARN helicasa y se prolonga desde el aa 181 hasta el 631. Utiliza la energía liberada por el ATP para separar las dobles cadenas de ARN o para desenmarañar zonas del ARN monocatenario que presenten intensiva estructura secundaria. Su actuación es esencial para la replicación del ARN del VHC, pero sus funciones precisas permanecen desconocidas. El polipéptido de 54 aa NS4A funciona como cofactor de la función serina proteasa de la NS3.

El complejo NS3/4A no se localiza sólo en la membrana del RE, sino que se encuentra también, aunque en menor proporción, en la membrana mitocondrial, o membranas asociadas a la mitocondria, que podrían desactivar a proteínas mitocondriales del hospedador como la RIG-1 que es una ARN helicasa con numerosas funciones (Moradpour y Penin, 2013; Karin, 2015).



**Figura 5.** Representación tridimensional de NS3 (gris) y la parte N-terminal de NS4A (azul). La triada catalítica se representa en magenta y la helicasa NS3 en verde. Los últimos 6 aa que permanecen tras la liberación de NS4A aparecen en naranja (Karin, 2015).

#### 6.1.2.3. NS4B

La proteína no estructural 4B desempeña un papel crucial en el reordenamiento de las membranas de las células hospedadoras. Esta remodelación de las membranas es necesaria para la formación del complejo de replicación viral, donde ocurre la síntesis del genoma (Briggs et al., 2015).

Este reordenamiento promueve la formación de un complejo de membranas, denominada Red Membranosa, o *Membranous Web* (MW), que se tratará en el punto ‘Ciclo de vida’. Aunque cada proteína viral contribuye a este reordenamiento, parece que NS4B desarrolla un papel fundamental (Briggs et al., 2015; Moradpour y Penin, 2013).

#### 6.1.2.4. NS5A

Se trata de una fosfoproteína homodimérica multifuncional compuesta por tres dominios que se encuentran separados por dos secuencias de baja complejidad (LCS, de *Low-Complexity Sequences*). Se encuentra anclada a la membrana del RE por una  $\alpha$ -hélice terminal anfipática.

NS5A es multifuncional, pero aún enigmática. A pesar de carecer de actividad enzimática, es esencial para el proceso de replicación del VHC, está implicada en la producción de nuevos viriones además de modular numerosos procesos virales. También se conoce que es sustrato de la Ciclofilina Humana 2 (una proteína encargada de isomerizar los péptidos de *cis* a *trans*), algo que se cree que le permite adoptar un mayor número de conformaciones, y consecuentemente, de funciones.

El Dominio 1 presenta un *zinc finger* y posee la capacidad de unirse al ARN, el Dominio 2 presenta actividad en la replicación del ARN, mientras que el Dominio 3 participa en el proceso de ensamblaje (Moradpour y Penin, 2013; Madan et al., 2015; Tellinghuisen, 2016).



La LCS-1, situada entre los dominios 1 y 2, es la zona de la proteína que contiene los sitios de fosforilación, dando lugar a dos estados de fosforilación: El estado basal promueve la replicación, mientras que el estado hiperfosforilado, fomenta la producción viral. Así pues, se tiende a asumir que NS5A es la encargada de modular la replicación del ARN del VHC.

Se conocen dos proteínas humanas encargadas de fosforilar a dicha proteína: Caseín-quinasa 1 $\alpha$  y Caseín-quinasa 2, aunque podrían estar implicadas un mayor número de proteínas (Tellinghuisen et al., 2016; Moradpour y Penin, 2013).

#### 6.1.2.5. NS5B

Es una ARN polimerasa dependiente de ARN. Se trata de una enzima esencial y única, responsable de la transcripción de cadenas complementarias de ARN a partir de una cadena de ARN molde. Esta enzima presenta una típica estructura palma-dedo-pulgar, donde el dominio de la palma es sensible a inhibición alostérica. Asimismo, el sitio activo de NS5B es también sensible a falsos sustratos. La estructura de NS5B es común para todos los genotipos del virus, por lo que los antivirales de acción directa (AAD) que inhiben a esta proteína presentan actividad pangenotípica (Moradpour y Penin, 2013; Barth et al., 2016).

### 6.1.3. Ciclo de vida

#### 6.1.3.1. Entrada, translación y procesamiento

Según el actual conocimiento del VHC, se transmite a través de sangre e inicia su ciclo en el hospedador una vez que alcanza su liberación en el torrente sanguíneo. Estas partículas virales que viajan por la sangre, pueden unirse a lipoproteínas (como colesterol VLDL y LDL), asociarse a inmunoglobulinas o continuar su viaje por el torrente sanguíneo como partículas libres, aunque las lipoproteínas son el único vehículo que le permiten al VHC la entrada al hepatocito (Scheel y Rice, 2013; Karin, 2015; Douam et al., 2016).

Una vez que la partícula viral llega a la superficie del hepatocito adherida a la lipoproteína, se produce la interacción VHC-hospedador, y consecuentemente la entrada. Las proteínas implicadas en la interacción VHC-hospedador son numerosas.

Primero establece interacciones inespecíficas con glicosaminoglicanos y sidecanos, (estos últimos son receptores de LDL) para luego establecer interacciones específicas, que se unen directamente con E2, como el Receptor Scavenger de la clase 1B (SRB1) y la tetrapasnina CD81.

El complejo formado por la lipopartícula viral y los factores de entrada migra hacia la zona donde los hepatocitos se unen, siendo allí donde se dan las interacciones con Claudina 1 y Ocludina, que promueven la entrada del VHC en el hepatocito en un proceso de endocitosis pH y clatrina dependiente (Karin, 2015; Douam et al., 2016).

Una vez liberado en el citosol, la vesícula envuelta en clatrina se une a la proteína motor del hospedador llamada dineína que la transporta sobre los microtúbulos para llegar al RE, donde se acidifica la superficie de la vesícula y permite la fusión de la membrana viral y la membrana endosomal. Tras dicha unión se libera de la nucleocápsida el ARN desnudo al citosol, uniéndose éste a la Región No Traducible-5' (5'-NTR) que constituye el sitio de unión al ribosoma.

El ribosoma es captado por un translocón sobre la membrana del RE y se traduce la poliproteína que va escindiéndose como se muestra en la Figura 1 (pág. 17) (Moradpour y Penin, 2013; Karin, 2015; Douam et al., 2016), y una vez escindidas, se insertan en la membrana del RE.

Estas proteínas virales, además de otros factores celulares, inducen la formación de la MW, que genera un ambiente propicio para la replicación y el ensamblaje viral, pues separa físicamente estos procesos del citosol hospedador, de modo que encubre estos procesos virales, limitando la respuesta inmune del hospedador y generando un entorno menos hostil para los intermedios de la replicación y el ensamblaje (Lohmann, 2013; Wozniak et al., 2016).

#### 6.1.3.2. Replicación

La actividad ARN polimerasa ARN dependiente de NS5B además de las otras proteínas no estructurales, catalizan el proceso de replicación, que comienza con la síntesis de una doble cadena de ARN intermediaria, que se separan para que la cadena negativa sea el modelo del que se generen múltiples copias de cadena positiva de ARN. Dichas copias van a ser utilizadas para replicación, traducción y/o formar parte de las nucleocápsidas nacientes (Lohmann, 2013; Scheel y Rice, 2013).

#### 6.1.3.3. Ensamblaje y liberación

El ensamblaje viral es un proceso estrechamente regulado y aún no se acaba de entender. Se asume que NS5A transporta al ARN viral hasta dentro de una nucleocápsida de proteínas *core* previamente formada, y que a continuación, se recubre de una membrana derivada del RE que trae ancladas a E1, E2, p7 y NS2, así como otros factores del hospedador, como ApoE, quedando E1, E2 y ApoE hacia la cara exterior.

En este momento la partícula viral estaría lista para ser excretada por exocitosis y podría ser liberada al torrente sanguíneo o al hepatocito anejo (Scheel y Rice, 2013; Douam et al., 2016).

## 6.2. Quimioterapia

Actualmente existen tres dianas terapéuticas con utilidad clínica y para las que hay desarrollados AAD (Tabla 1). Son: (1) inhibidores de la proteasa NS3/4A (-previr), (2) inhibidores de la proteína reguladora del ciclo viral NS5A (-asvir) y (3) inhibidores la ARN polimerasa dependiente de ARN NS5B.

**Tabla 1.** Medicamentos aprobados para el tratamiento de la Hepatitis C

Laboratorio	Medicamento	Fármaco	Diana	Genotipo	Año*	Posología
Gilead	Sovaldi®	Sofosbuvir	NS5B	Todos	2014	1 cp./24 h
Gilead	Harvoni®	Sofosbuvir Ledipasvir	NS5B NS5A	Todos	2015	1 cp./24 h
AbbVie	Viekirax®	Paritaprevir Ombitasvir Ritonavir	NS34A NS5A **	1 y 4	2015	2 cp./24 h
AbbVie	Exviera®	Dasabuvir	NS5B	1	2015	1 cp./12 h
Bristol-Myers Squibb	Daklinza®	Daclatasvir	NS5A	1, 3 y 4	2015	1 cp./24 h
Jassen	Olysio®	Simeprevir	NS34A	1 y 4	2014	1 cap./24 h
Merk	Zepatier®	Grazoprevir Elbasvir	NS34A NS5A	1 y 4	2016	1 cp./24 h

Cp.: comprimido, cap.: cápsula. \*Año de aprobación \*\*Booster

En el mercado farmacéutico europeo existen nueve principios activos, incluidos en siete medicamentos basados en los AAD de cinco laboratorios diferentes (Tabla 1) y su uso se rige por la *European Association for Study of the Liver (EASL) Recommendation on Hepatitis C* así como por el Plan Estratégico del Sistema Nacional de Salud (SNS) para el Abordaje de la Hepatitis C.

Estas guías clínicas tienen en cuenta: Genotipo del virus, si el paciente es *naïve*, si ha sufrido un fracaso terapéutico o una recaída, si presenta cirrosis e incluso si requiere trasplante. Y los criterios de elección tienen tanto base clínica como económica.

**Tabla 2.** Tratamientos de primera elección del Plan Estratégico del SNS con acuerdos de financiación del Ministerio y acuerdos propios de Andalucía

Situación del paciente	Tratamiento	Coste por paciente (€)	SVR (%)
Genotipo 1	Sofosbuvir + Simeprevir	9.812	97
Genotipo 2	Sofosbuvir	9.812	97
Genotipo 3	Sofosbuvir + PEG-INF $\alpha$ + Ribavirina*	11.213	94
Genotipo 4	Ombitasvir + Paritaprevir + Ritonavir	9.568	91
Genotipos 5 y 6	Sofosbuvir + PEG-INF $\alpha$ + Ribavirina*	11.213	97
Cirrosis descompensada	Genotipo 1 Sofosbuvir + Ledipasvir	11.962	96
	Genotipo 2 Sofosbuvir + Ribavirina	9.812	83
	Genotipo 3 Sofosbuvir + Ledipasvir + Ribavirina*	11.962	79
	Genotipo 4 Sofosbuvir + Ledipasvir	11.962	100
Requiere trasplante	Sofosbuvir + Simeprevir	9.812	83

\*Los costes de Ribavirina han sido despreciados

**Tabla 3.** Tratamientos de primera elección del *EASL Recommendation on Hepatitis C 2016* con acuerdos de financiación del Ministerio y acuerdos propios de Andalucía

Situación del paciente		Tratamiento	Coste por paciente (€)	SVR (%)
Genotipo 1		Sofosbuvir + Ledipasvir	11.962	96
Genotipo 2		Sofosbuvir + Velpatasvir	**	100
Genotipo 3		Sofosbuvir + Velpatasvir	**	88
Genotipo 4		Sofosbuvir + Ledipasvir	11.962	91
Genotipos 5 y 6		Sofosbuvir + Ledipasvir	11.962	96
Cirrosis descompensada	Genotipo 1	Sofosbuvir + Ledipasvir	**	96
	Genotipo 2	Sofosbuvir + Velpatasvir	**	91
	Genotipo 3	Sofosbuvir + Daclatasvir + Ribavirina*	20.108	63
	Genotipo 4	Sofosbuvir + Ledipasvir	11.962	100
Requiere trasplante		Sofosbuvir + Ledipasvir + Ribavirina*	11.962	100

\*Los costes de Ribavirina han sido despreciados \*\* Fuera del acuerdo (No financiado)

El SNS y la EASL parecen no coincidir en los tratamientos de primera elección (Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente). Mientras la EASL presenta estrategias libres de interferón en todos los casos y parece estar cerca de conseguir estrategias libres de Ribavirina, el SNS presenta aún PEG-IFN $\alpha$  en *triple terapia* para el tratamiento de los genotipos 3, 5 y 6.

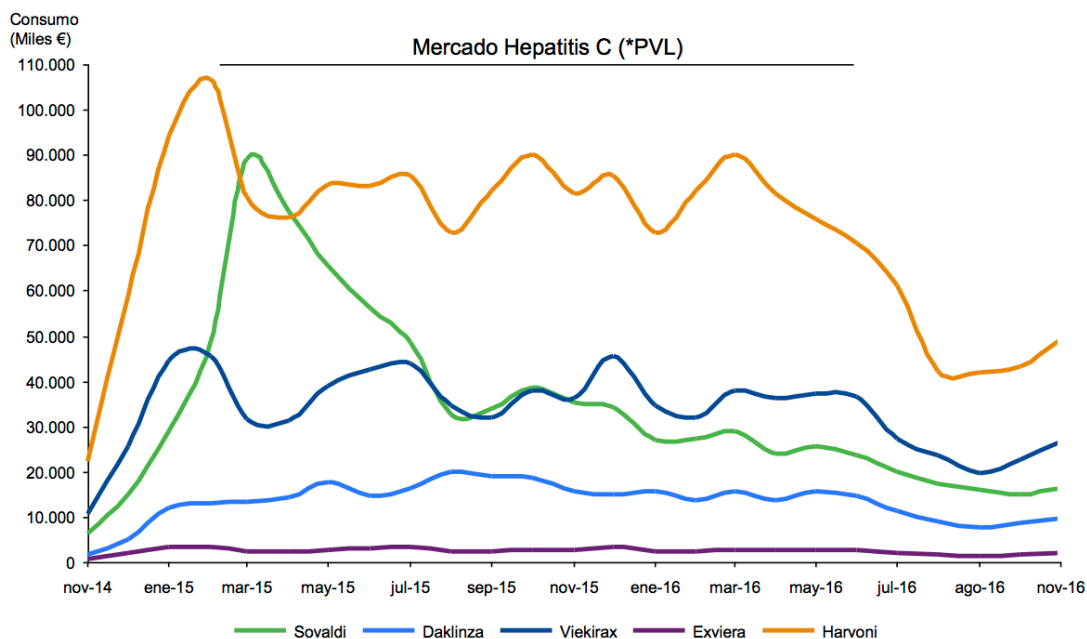
Con respecto a la eficacia de los tratamientos, en el tratamiento del genotipo 3, la estrategia del SNS consigue una SVR del 94% mientras que la de la EASL es del 88%, por lo que en términos de eficacia parece mejor la estrategia por la que opta el SNS aunque esté basada en *triple terapia* de Sofosbuvir + PEG-IFN $\alpha$  + Ribavirina.

Por otra parte, el SNS propone usar Sofosbuvir + Ledipasvir + Ribavirina para el tratamiento de la HCC con cirrosis descompensada producida por genotipo 3 con una SVR del 79% mientras que la EASL propone el uso de Sofosbuvir + Daclastavir + Ribavirina. El tratamiento propuesto por la EASL presenta una SVR del 63% y un coste 1.7 veces superior. Clínicamente presentan ambos tratamientos RAM muy similares.

En el plano económico, la EASL propone en todos los casos estudiados tratamientos del mismo coste o más caros que el SNS, en ningún caso tratamientos de menor coste por paciente debido a la búsqueda de estrategias libres de interferón que parece un interés levemente marginado en las estrategias planteadas por el SNS.

Aun así, Harvoni® (Sofosbuvir + Ledipasvir) parece liderar el mercado de Hepatitis C en España (Figura 6), pues cuenta con amplia ventaja sobre Viekirax® (Paritaprevir + Ombitasvir + Ritonavir) y relega a Exviera® (Dasabuvir) a un uso casi residual.

Dicha ventaja se debe a múltiples factores. La principal ventaja que muestra Harvoni® con respecto al otro inhibidor de la NS5B en el mercado (Exviera®) es su actividad pangenotípica, además Harvoni permite una pauta posológica que facilita la adherencia del paciente a la medicación.



**Figura 6.** Consumo de medicamentos de la Hepatitis C en España. \*Coste calculado según PVL sin incluir descuentos ni techos de gasto (Almarza, 2017).

El impacto tanto clínico como económico de Harvoni® (Sofosbuvir + Ledipasvir) hace interesante la focalización en este producto.

### 6.2.1. Sofosbuvir

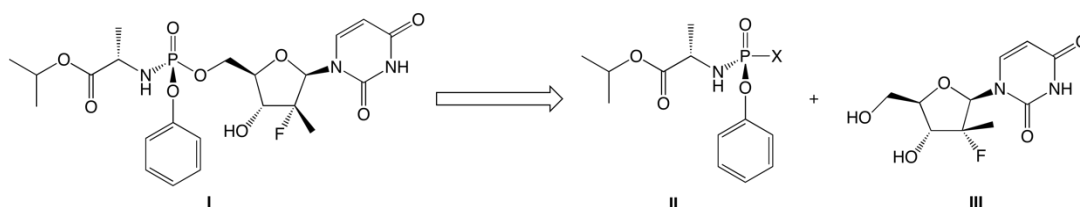
Se trata del primer profármaco nucleósido inhibidor de la NS5B que presentaba un grupo 5'-fosfonato, algo que le confirió a la molécula estabilidad metabólica y permeabilidad de membrana.

Cuando el profármaco entra en la célula diana, el grupo 5'-fosfonato se transforma, por la maquinaria enzimática de la célula, en el grupo 5'-fosfato. Esto mejora de manera dramática las propiedades farmacocinéticas del fármaco.

La molécula está compuesta de dos bloques principales: un análogo bioactivo de la uridina y el fosforamidato que le proporciona a la molécula sus características físicoquímicas.

### 6.2.1.1. Diseño de Sofosbuvir

Aunque el diseño del fármaco comenzó con el objetivo de sintetizar un citidín-derivado, lo cierto es que los investigadores se focalizaron en conseguir un fármaco con mejores propiedades farmacocinéticas, y en la investigación del citidín-derivado vieron que mediante la enzima citilidato desaminasa se llegaba hasta un derivado trifosfato de la uridina con alta capacidad de inhibir a la NS5B y con una semivida de 38 h.



**Esquema 1.** Retrosíntesis de Sofosbuvir (I). Estructura del bloque fosforamidato (II). Estructura del análogo fluorado de la uridina (III).

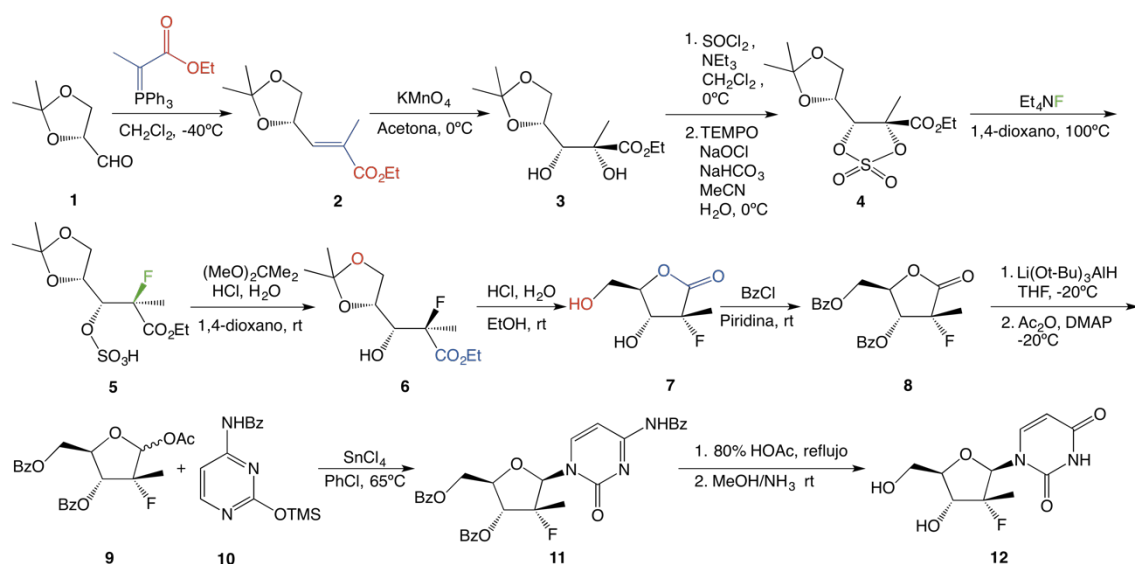
La generación de un uridín-derivado presentaba un obstáculo que habría que superar para poder tener un fármaco útil: el nucleósido derivado de la uridina fluorado y metilado en C2' no era sustrato de ninguna enzima para ser fosforilado, y por lo tanto, no podría llegar a ser un nucleótido trifosfato, por lo que no tendría actividad frente al VHC (Sofia et al., 2010).

Dicho obstáculo metabólico hizo pensar a los investigadores en la generación de un profármaco, que generase un uridín-derivado monofosfato, para el que sí existe maquinaria enzimática capaz de fosforilar y generar el nucleósido trifosfato.

### 6.2.1.2. Síntesis del nucleósido mediante fluoración en etapa temprana

A pesar de que la síntesis del nucleósido natural uridina puede ser relativamente sencilla, la presencia del centro quiral C2' fluorado en el compuesto **III** (Esquema 1), incrementa significativamente la complejidad de la molécula. La adición del flúor al C2' es objeto de discusión entre la comunidad científica: se han propuesto procesos de fluoración en etapa temprana y de fluoración tardía.

La necesidad de un proceso de preparación industrialmente posible, hace necesaria la creación de una ruta sintética altamente enantioselectiva, aunque presente un mayor número de pasos.



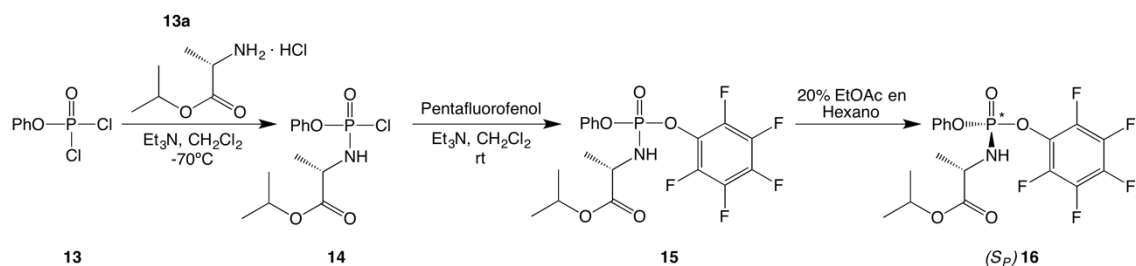
**Esquema 2.** Síntesis del nucleósido.

La obtención del compuesto uridín-fluorado **12** (Esquema 2) comienza con la conversión del isopropilidén gliceraldehído **1** a *syn*-diol **3** mediante una reacción de Wittig seguido de una reacción de dihidroxilación mediada por  $\text{KMnO}_4$ , que procede con una diastereoselectividad de 12:1. A continuación, el diol se convierte en dos pasos en el sulfato cíclico **4**, y éste es posteriormente tratado con fluoruro de tetraetilamonio, obteniéndose el producto **5**. La hidrólisis de los grupos sulfato y acetónido de **5** se realiza en dos pasos para asegurar la conversión del material de inicio y minimizar la formación de productos secundarios.

Finalmente, el compuesto **7** se transforma en el dibenzoato **8** seguido de reducción y acetilación para obtener el compuesto **9**, que será el reactivo en la glicosidación de Vorbrüggen catalizada por  $\text{SnCl}_4$ . En general, el rendimiento de esta vía de obtención del producto **12** a gran escala es del 6.4%, lo que repercute de manera directa en el coste del tratamiento (Barth et al., 2016).

#### 6.2.1.3. Síntesis del bloque fosforamido

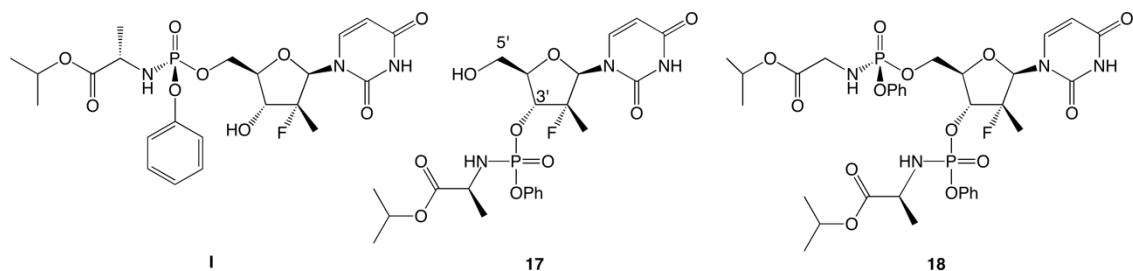
El compuesto **16** (Esquema 3, pag. 28) se prepara mediante la reacción de fenildiclorofosfato **13** con el hidrocloreto del éster isopropílico de la L-alanina (**13a**), seguido de la reacción con pentafluorofenol. Después de filtrar las sales, el sólido crudo, se tritura en una mezcla del 20% de acetato de etilo en hexano, donde sólo se solubiliza el isómero  $S_P$  (**16**), aislándose con una pureza del 98% (Schinazi et al., 2014).



**Esquema 3.** Síntesis del fosforamidato usado como reactivo en la síntesis de Sofosbuvir. La configuración quiral del átomo de fósforo se denota con una P en subíndice.

#### 6.2.1.4. Fosforamidación del nucleósido

El nucleósido del Sofosbuvir (**I**) presenta dos grupos hidroxilo que se pueden fosforilar, pudiendo formar el producto deseado **I**, fosforilado en HO-5' y dos productos secundarios no deseados **17**, fosforilado en HO-3' y **18**, difosforilado en HO-3' y HO-5' (Figura 7).

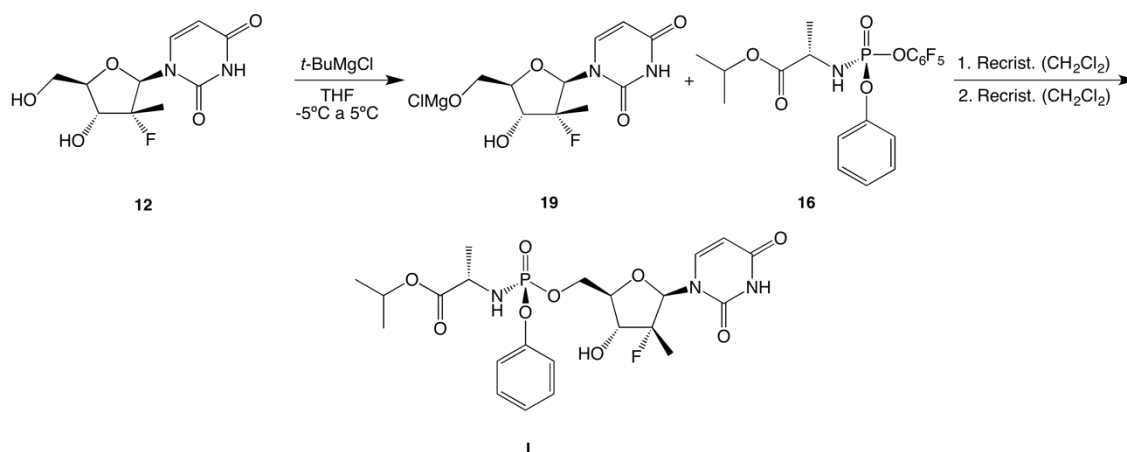


**Figura 7.** Productos resultantes de la fosforamidación del nucleósido de Sofosbuvir.

Los químicos orgánicos parecen coincidir a la hora de diseñar la estrategia para minimizar la generación de productos secundarios, convergiendo en una estrategia de activación básica (Esquema 4) que promueva la fosforilación del grupo hidroxilo localizado en 5' mediante el uso de un reactivo de Grignard ( $t\text{BuMgCl}$ ), que actúa como una base fuerte activando así el grupo HO-5' del nucleósido, de modo que el alcóxido formado ataca a **16** (Esquema 4) para obtener el fármaco deseado.

Se han optimizado las condiciones de reacción para la síntesis de **19** (Esquema 4). Se ha observado que la temperatura baja así como la adición lenta de los reactivos, evitan de manera importante la formación de **17** y **18**. Tras dos recrystalizaciones del producto, se obtiene Sofosbuvir (**I**) con una pureza del 99.7% y un rendimiento general del proceso del 68% (Schinazi et al., 2014; Barth et al., 2016).

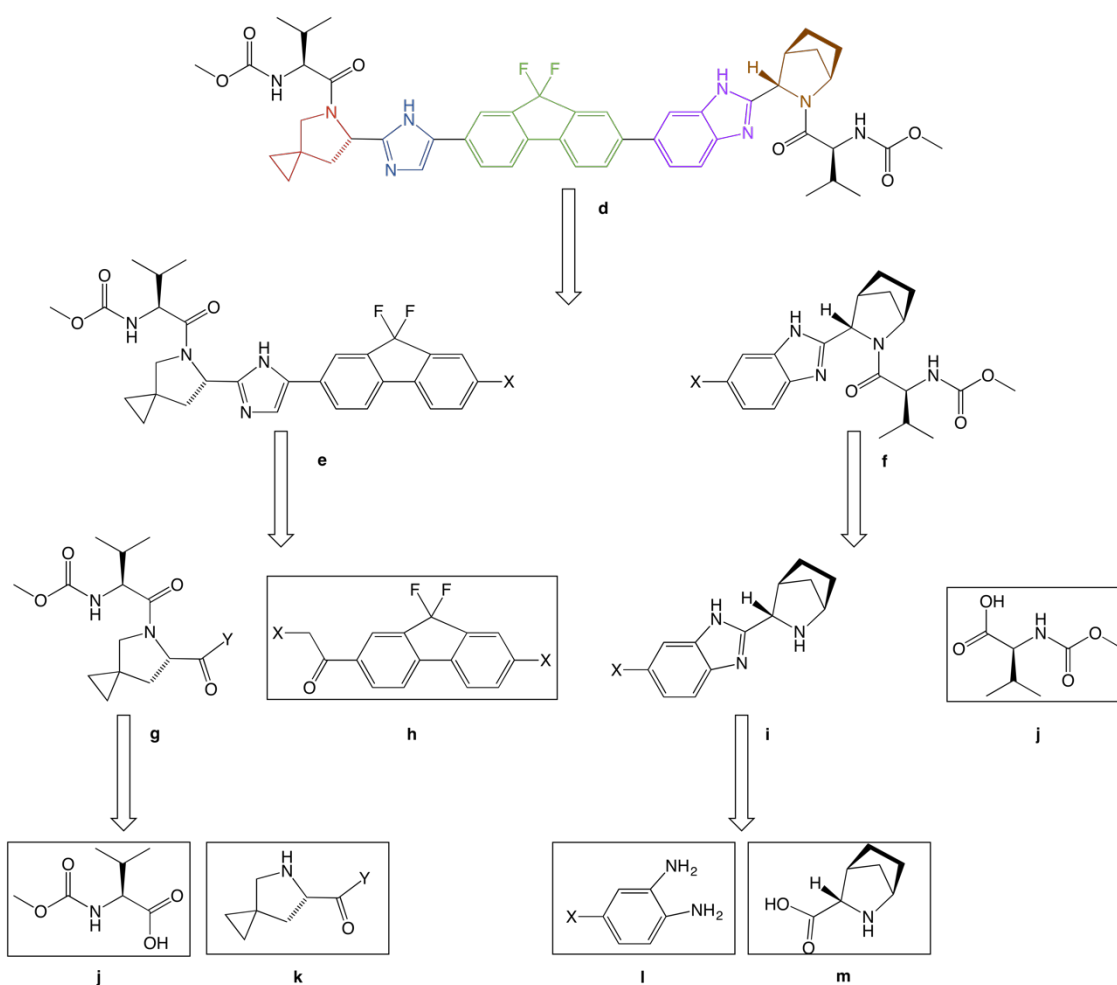




**Esquema 4.** Síntesis diastereoselectiva de Sofosbuvir.

### 6.2.2. Ledipasvir

Ledipasvir (**d**) es un fármaco que inhibe a NS5A del VHC, encargada de regular los procesos de ensamblaje, replicación y liberación viral.



**Esquema 5.** Retrosíntesis de Ledipasvir. El símbolo X representa donadores de electrones. El símbolo Y representa aceptores de electrones.

A diferencia de Sofosbuvir, Ledipasvir fue concebido para establecer efectos sinérgicos con otros AAD, así como para actuar frente a los genotipos virales más prevalentes (Genotipo 1) y facilitar la consecución de terapias libre de interferón y/o Ribavirina. Se trata de una molécula en la que se pueden identificar tres bloques (Esquema 5, pág. 29): un bloque de **fluoreno** central unido por un **anillo imidazólico** a un grupo **azaspiroheptano**, que a su vez se encuentra unido a una molécula de Moc-valina.

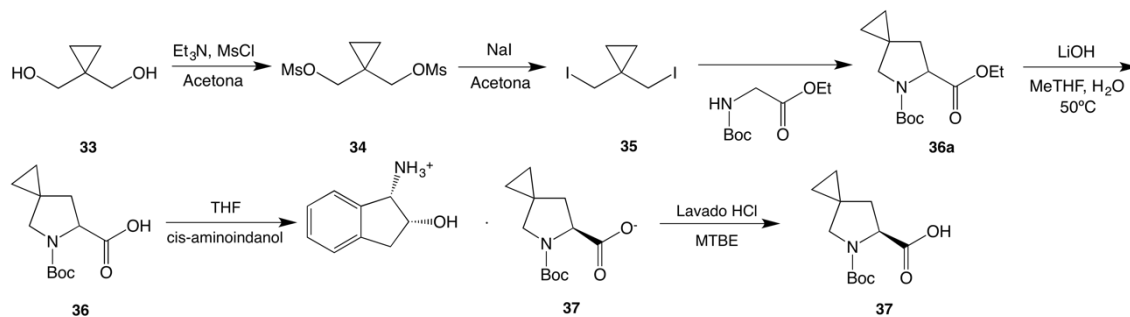
Por la otra parte, el grupo **fluoreno** central se encuentra unido mediante un ciclo de **benzoimidazol** a un grupo **azabicycloheptano**, que a su vez también se encuentra unido a una molécula de Moc-valina.

#### 6.2.2.1. Síntesis del bloque azaspiroheptano mediante resolución clásica

Para la síntesis del bloque azaspiroheptano enantiómericamente puro (**37**) se opta por la ruta clásica con *cis*-aminoindanol para la resolución del racémico **36** (Esquema 6).

El proceso comienza con la preparación del dimesilato **34**. Para ello, se disuelve el compuesto **33** en acetona fría (0 °C), y continuación se añade lentamente Et<sub>3</sub>N y cloruro de metanosulfonilo (MsCl). El producto obtenido (**34**) se hace reaccionar con NaI en acetona aislándose el dihaluro derivado **35**.

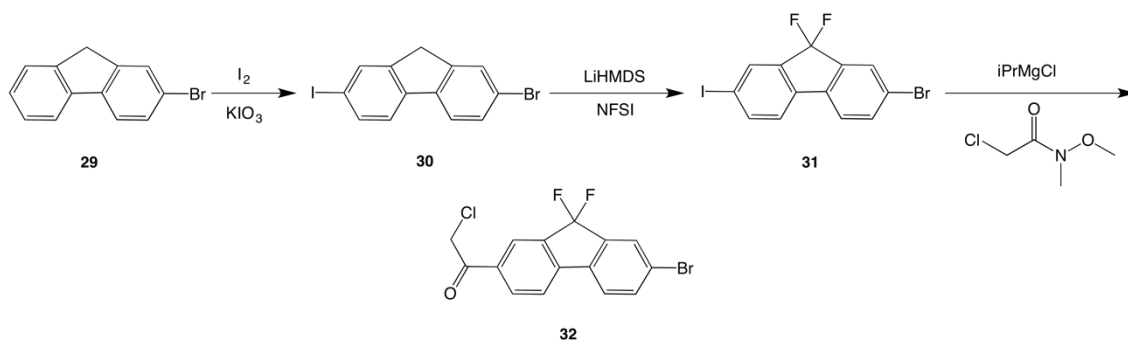
La síntesis continua haciendo reaccionar el compuesto recién obtenido **35** con el éster etílico de la *N*-terc-butoxicarbonilglicina empleando hidruro de sodio en dimetilacetamida. El compuesto **36a**, obtenido en el paso anterior, se somete a una reacción de saponificación con hidróxido de litio para obtener, tras neutralizar con HCl, el ácido carboxílico **36** como mezcla racémica. Finalmente, la mezcla racémica se resuelve empleando *cis*-aminoindanol, lo que permite aislar la sal de **37** enantiómericamente pura. El compuesto **37** se obtiene puro tras tratar con HCl con un rendimiento del 33% (Scott et al., 2014; Link et al., 2014).



**Esquema 6.** Síntesis del bloque azaspiroheptano mediante la resolución clásica de **36**.

### 6.2.2.2. Preparación del bloque fluoreno para unión con los bloques adyacentes

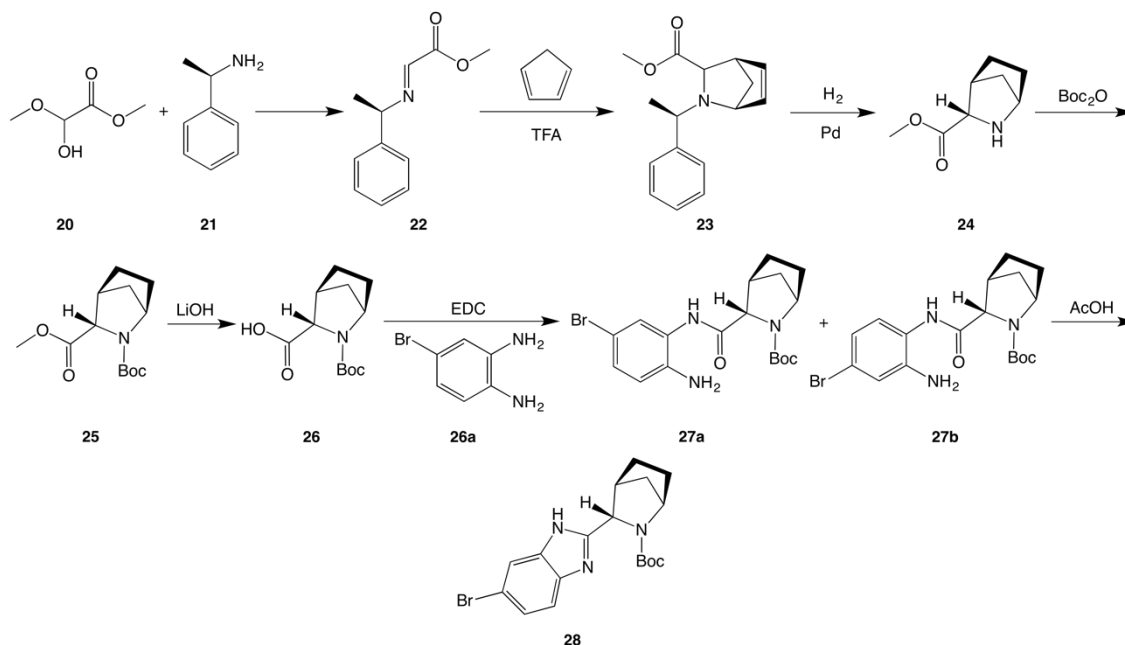
A una mezcla de 2-bromo-7-yodofluoreno (**30**) (Esquema 7) y *N*-fluorobencenosulfonimida (NFSI) en tetrahidrofurano (THF) enfriada a  $-68^{\circ}\text{C}$ , se le añade bis(trimetilsilil)amiduro de litio (LiHMDS), tras procesar la mezcla de reacción se obtiene el compuesto **31**. A continuación, se hace reaccionar con 2-cloro-*N*-metoxi-*N*-metilacetamida en presencia de cloruro de isopropilmagnesio ( $i\text{PrMgCl}$ ) para dar **32**. El rendimiento global del proceso de obtención de **32** fue del 55% (Scott, 2014).



Esquema 7. Síntesis del bloque fluoreno.

### 6.2.2.3. Síntesis del bloque azabicicloheptano y grupo benzoimidazol

En la síntesis del ciclo azabicicloheptano se incluye también la síntesis del ciclo benzoimidazol (Esquema 7). Para construir el bicyclo, se lleva a cabo una reacción de Diels-Alder entre el ciclopentadieno y el iminoéster **22** (Esquema 8).

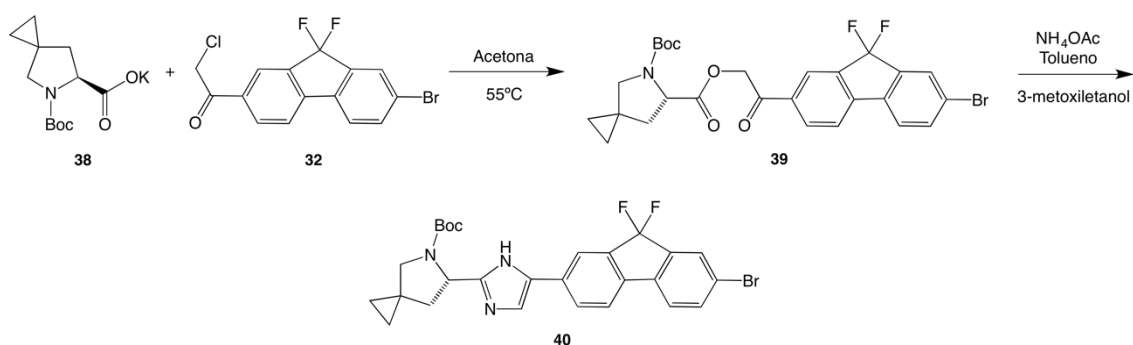


Esquema 8. Síntesis del bloque azabicicloheptano.

A continuación, se lleva a cabo una hidrogenolisis catalizada por Paladio (Pd), y el grupo amino resultante se protege en forma de *N*-Boc-derivado. La saponificación de **25** con LiOH, permite obtener el ácido carboxílico que se hace reaccionar con la amina aromática **26a** en presencia del agente de condensación 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), obteniéndose los isómeros **27a** y **27b**, que tras la adición de ácido acético forman el anillo de benzoimidazol en **28** (Scott, 2014).

#### 6.2.2.4. Unión de los bloques

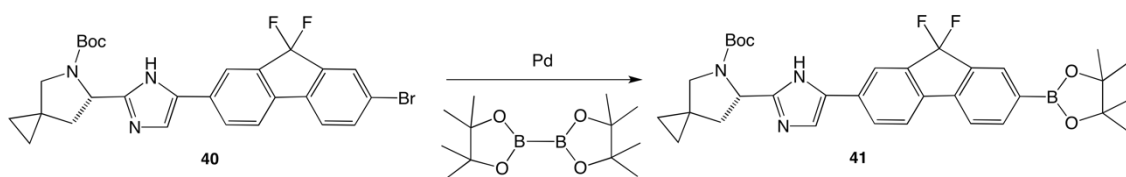
Para unir el bloque azaspiroheptano **38** con el bloque fluoreno **32**, generando un anillo imidazólico entre ambos, se siguen las reacciones mostradas en el Esquema 9. En primer lugar, se hace la reacción entre **38** y **32** en acetona a 55°C para obtener **39**, que una vez aislado y purificado, se hace reaccionar con acetato de amonio aislándose el compuesto intermedio **40** (Scott, 2014).



**Esquema 9.** Condensación imidazólica de los bloques azaspiroheptano y fluoreno.

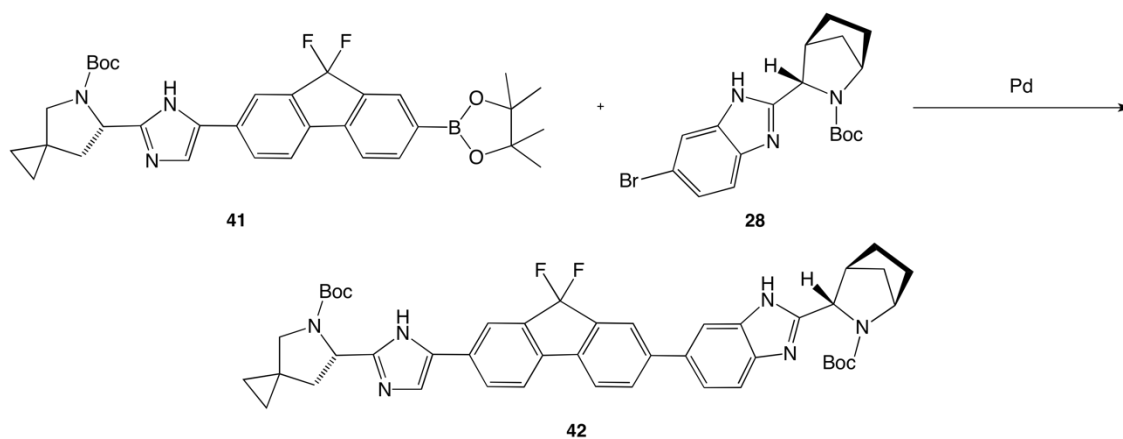
A continuación, para el acoplamiento de **40** (Esquema 9) con el bloque azabicycloheptano-benzoimidazol (**28**) (Esquema 8) mediante la reacción de Suzuki-Miyaura se requiere la adición de pinacolato de boro a uno de los bloques. En este caso, se le adicionará al bloque fluoreno-imidazol-azaspiroheptano.

La reacción de Suzuki-Miyaura (Esquema 10) es una reacción de formación de un enlace carbono-carbono que viene catalizada por metales de transición, y su desarrollo implica el uso de compuestos orgánicos de boro y complejos de paladio (Loyd-Jones y Lennox, 2014; Scott, 2014). Esta reacción es interesante, entre otros motivos, por permitir la recuperación de materiales de partida y su posterior reutilización.



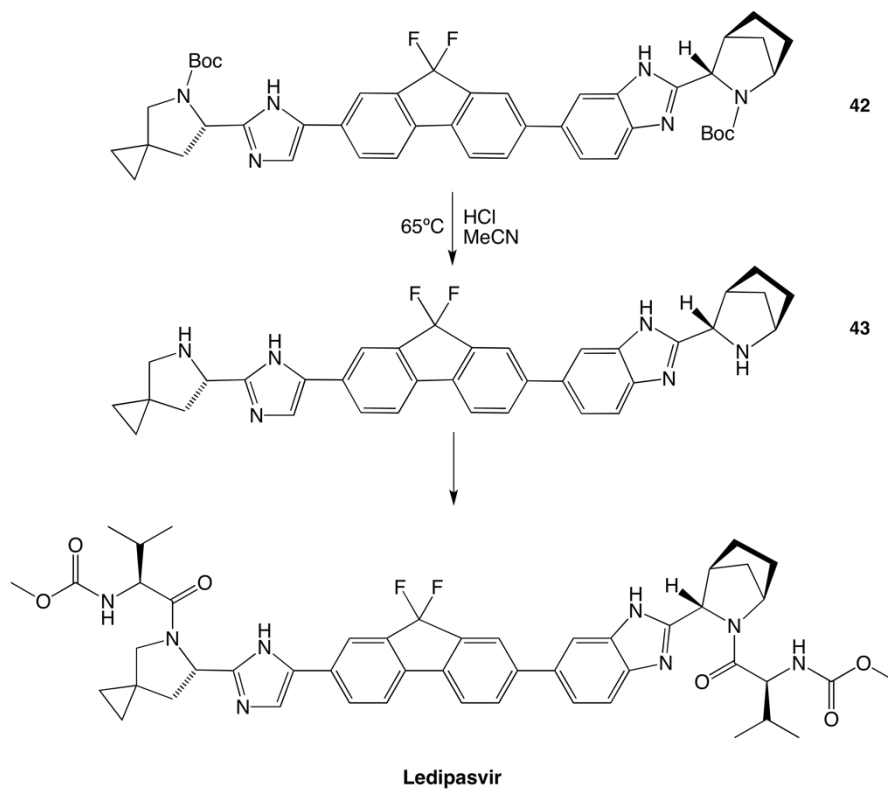
**Esquema 10.** Obtención del reactivo borado para la reacción de Suzuki-Miyaura.

Seguidamente, se añade **28** a **41** en presencia del complejo de paladio para dar **42** mediante la reacción de Suzuki-Miyaura (Esquema 11) (Lloyd-Jones y Lennox, 2014).



**Esquema 11.** Unión del bloque azabicloheptano con el bloque fluoreno mediante la reacción de Suzuki-Miyaura.

Para finalizar, se elimina el grupo protector Boc del compuesto **42** empleando ácido clorhídrico en acetonitrilo a 65°C, y la función amina obtenida se hace reaccionar con Moc-valina y un agente de condensación para obtener Ledipasvir (Esquema 12).



**Esquema 12.** Desprotección de aminas y acoplamiento de amidas para la síntesis de Ledipasvir.

## 7. CONCLUSIONES

Desde el descubrimiento de los mecanismos de transmisión del VHC, la incidencia de infecciones ha disminuido de manera drástica. En estos últimos años, con la inclusión de los nuevos AAD con altas tasas de curación podrían hacernos pensar que estamos cerca de la erradicación de esta enfermedad, pero esta afirmación sería tan superficial como aventurada.

Sobre el papel, una tasa de curación del 95% de los casos parece valiosa, pues sólo el 5% de los pacientes tratados no responden al tratamiento, pero si en vez de porcentajes hablamos de número de personas, estaríamos hablando de alrededor de 9 millones de personas para las que no habría tratamiento con AAD.

Por otra parte, cuando hablamos de los tratamientos con AAD, hablamos de tratamientos en Fase IV de experimentación, que aun estando comercializados y generando unos datos excelentes, están aún sometidos a riguroso control por su falta de experiencia clínica.

Además, resultaría ilógico plantear un esquema de erradicación de la enfermedad basado en un tratamiento post-infección, así pues, hay dos puntos clave para la erradicación de la enfermedad: (1) *Screening* sistemático del anticuerpo anti-VHC para conocer la prevalencia real de la enfermedad, pues se estima que muchas de las personas infectadas desconocen su infección y (2) el desarrollo de una vacuna profiláctica que se incluya en los calendarios de vacunaciones y que fuese accesible para los países forman parte del grupo de mayor prevalencia de la HCC, muchos de ellos en vías de desarrollo.

Para el avance de esa vacuna parece fundamental el conocimiento y caracterización de las proteínas de la envoltura E1 y E2, pues se conoce que son las encargadas de interaccionar con la respuesta inmune del hospedador, por lo que el desarrollo de una posible vacuna profiláctica es probable que pasase por la producción biotecnológica de dichas proteínas y su aplicación, lo que requiere una minuciosa identificación de las HVRs que presentan dichas proteínas.

En cuanto a los quimioterápicos aquí discutidos, se puede concluir que Sofosbuvir es el buque insignia de los AAD, pero se han detectado ciertas mutaciones en NS5B que oponen resistencia a su capacidad antiviral, por lo que es posible que en los próximos años se necesiten AAD de segunda línea que sigan siendo efectivos frente a dichas mutaciones. Por su parte, Ledipasvir en un futuro no muy lejano tendrá duros competidores que en este momento se encuentran en

Ensayos Clínicos, como Samatasvir, que presumiblemente será el primer inhibidor de NS5A pangenotípico (Zou et al., 2014).

En el plano industrial, promover la investigación para la consecución de estrategias para la síntesis del nucleósido uridín-derivado de Sofosbuvir que presenten buen rendimiento, alta enantioselectividad y que, a su vez, sean escalables para producción industrial parece crucial para la obtención de un principio activo efectivo, eficaz y eficiente, así como ‘farmacoeconómico’.

En cuanto a la forma de tratar la Hepatitis C, la *EASL Recommendations on Hepatitis C* parece priorizar el planteamiento de estrategias libres de PEG-INF $\alpha$  y/o Ribavirina, algo que genera tratamientos muy tolerables y adherentes, pero que en algunos casos supone una disminución considerable de la SVR, mientras que el SNS aún sigue presentando estrategias con PEG-INF $\alpha$  para algunos casos concretos, pero que consiguen una mejor SVR.

La quimioterapia de la Hepatitis C ha supuesto una importantísima mejora y una esperanza para los pacientes, por lo que ha de ser considerada en las estrategias de tratamiento para la Hepatitis C, pero la forma de erradicar el virus es la prevención y el diagnóstico sistemático de una forma que sea permisible para países en vías de desarrollo. Así como generación de nuevas rutas sintéticas que permitan disminuir los costes de producción de dichos fármacos y por lo tanto, los costes finales.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Centro de Información del Medicamento de la AEMPS – CIMA. Madrid. [fechas de acceso entre diciembre 2016 y mayo 2017] <http://cima.aemps.es>.
- Almarza C. Evolución y tendencias del Mercado farmacéutico español. Madrid: Quintiles IMS; 2016.
- Barth R, Rose C, Schöne O. Synthetic Routes to Sofosbuvir. En: Casar Z, editor. Synthesis of Heterocycles in Contemporary Medicinal Chemistry. 1ª edición. Ljubljana: Springer; 2016. 51-88.
- Briggs ELA, Gomes RGB, Elhussein M, Collier W, Findlow IS, Williamson PTF. Interaction between the NS4B amphipatic 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.
- Davis GL, Alter MJ, El-Serag H, Poynard R, Jennings LW. Aging of the hepatitis C virus infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology*. 2010; 138:513-521.
- Davis GL. Epidemiology of Chronic HCV. En: Shiffman ML, editor. Chronic Hepatitis C virus: Advances in treatment, promise for the future. 1ª Edición. New York: Springer; 2012. 3-11.
- Douam F, Ding Q, Ploss A. Recent advances in understanding hepatitis C. *F1000Research*. 2016; 5(F100 Faculty Rev):131.
- European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. Geneva: European Association for the Study of the Liver. 2016.
- Falcón V, Acosta-Rivero N, González S, Dueñas-Carrera S, Martínez-Donato G, Menéndez I, Garateix R et al. Ultrastructural and biochemical basis for hepatitis C virus morphogenesis. *Virus Genes*. DOI: 10.1007/s11262-017-1426-2
- Feedman H, Logan MR, Man Law JL, Houghton M. Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infect Dis*. 2016; 2:749-762.
- Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2014; 61(1 Suppl):S47-S57
- Hagan H, Pouget ER, Williams IT, Garfein RL, Strathdee SA, Hudson SM, et al. Attribution of hepatitis C virus seroconversion risk in young injection users in 5 US cities. *J Infect Dis*. 2010; 201:378-385.

- Hanafiah KM, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013;57:1333-1342.
- Karin Belfrage A. Design and Synthesis of Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitors. [Tesis Doctoral]. Uppsala: Uppsala University; 2016.
- Kong L, Giang E, Nieuwsma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y et al. Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Core Structure. *Science*. 2013; 342:1090-194.
- Kwong AD. The HCV revolution did not happen overnight. *ACS Med Chem Let.* 2014;5(3):214-220.
- Lawitz E, Poordad F, Wells J, Hyland RH, Yang Y, Dvroy-Sobol H et al. Sofosbuvir-Velpatasvir-Voxilaprevir with or without Ribavirin in Direct-Acting Antiviral-Experienced patients with Genotype 1 Hepatitis C Virus. *Hepatology*. 2017. DOI: 10.1002/hep.29130.
- Link JO, Desai MC, Taylor JG, Xu L, Mitchell M, Guo H et al. Discovery of Ledipasvir (GS-5885): A potent, Once-Daily oral NS5A Inhibitor for the Treatment of Hepatitis C virus infection. *J Med Chem*. 2014; 57: 2033-2046.
- Lloyd-Jones GC, Lennox AJJ. Selection of boron reagents for Suzuki-Miyaura coupling. *Chem. Soc. Rev.* 2014; 43: 412-443.
- Lohmann V. Hepatitis C Virus RNA replication. En: Bartenschlager R, editor. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. 1ª edición. Heidelberg: Springer; 2013. 113-142.
- Madan V, Dujardin M, Montserret R, Puneet A, Huvent I, Launay H. A Proline-Tryptophan Turn in the Intrinsically Disordered Domain 2 of NS5A Protein is essential for Hepatitis C virus RNA Replication. *J Biol Chem*. 2015;290(31):19104-19120.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Plan Estratégico para el abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad [PDF]. [Consultado en abril 2017]. Disponible en: [https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/docs/plan\\_estrategico\\_hepatitis\\_C.pdf](https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/docs/plan_estrategico_hepatitis_C.pdf)
- Moradpour D, Penin F. Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. En: Bartenschlager R, editor. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. 1ª edición. Heidelberg: Springer; 2013. 113-142.
- Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med*. 2013; 19(7): 837-849.
- Schinazi R, Pradere U, Garnier-Amblard E, Coats S, Amblard F. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem Rev*. 2014; 114: 9154-9218.
- Scott RW, Vitale JP, Matthews KS, Teresk MG, Formella A, Evans JW, inventores. Gilead

Sciences, Inc., titular. Synthesis of antiviral compound. WO20131884702A1. CA28755081A1.

- Servicio Andaluz de Salud. Plan Estratégico para el abordaje de la Hepatitis C. Sevilla: Servicio Andaluz de Salud, Consejería de Sanidad. 2016.
- Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014; 59(1): 318-327.
- World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection [en línea]. [Ginebra:2014. Consultado en marzo 2017]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111747/1/9789241548755\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111747/1/9789241548755_eng.pdf?ua=1&ua=1).
- World Health Organization. Hepatitis C. 2014 [en línea]. [Consultado en marzo 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
- Wozniak RW, Neufeldt CJ, Joyce MA, Van Buuren N, Levin A, Kirkegaard K. The Hepatitis C virus Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites. *PLOS Pathog*. 2016; 12(2):e1005428.
- Zou XJ, Vince B, Hill JM, Lawitz EJ, Murillo A, Chen J. A randomized, double-blind, multiple-dose study of the pan-genotypic NS5A inhibitor samatasvir in patients infected with hepatitis C virus genotype 1, 2, 3 or 4. 2014; 60(5): 920-927.