



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
TRABAJO DE FIN DE GRADO**

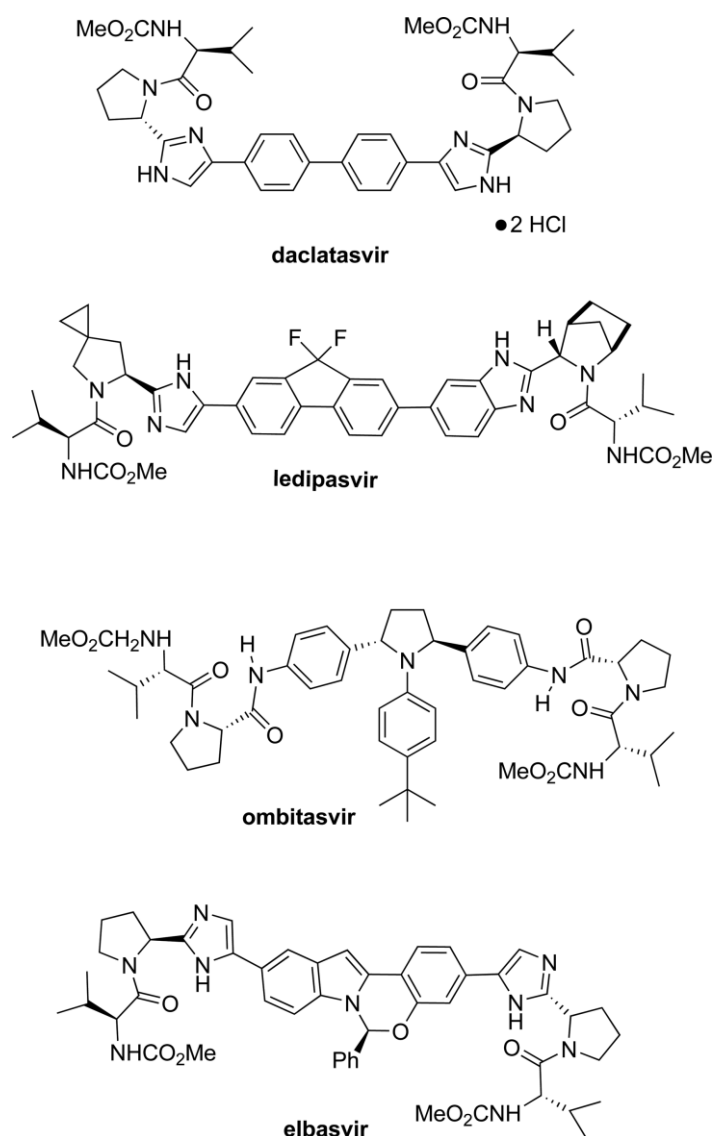
**TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C:
FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA
PROTEÍNA NS5A**

Autor: Marta Hortelano Morales

Tutor: María Loreto Salazar Martínez de Pisón

Convocatoria: Junio 2018

RESUMEN



La hepatitis C es una enfermedad hepática provocada por el virus de la hepatitis C (VHC), que presenta una elevada prevalencia ya que afecta a un 3% de la población mundial (180 millones de personas aproximadamente).

El genoma del VHC está compuesto por ARN monocatenario y su expresión da lugar a una poliproteína de unos 3000 aminoácidos, que tras ser procesada da lugar a tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y siete no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B).

El primer tratamiento contra la hepatitis C utilizado fue la terapia clásica, que se basa en la combinación de interferón α pegilado (PEG-IFN- α) y Ribavirina. Dado que este tratamiento tiene una eficacia limitada, en el año 2011 gracias a los avances en los estudios del ciclo de vida del VHC, aparecen los antivirales de acción directa (AADs) aprobados para su uso en combinación con la terapia tradicional. Estos nuevos

antivirales presentan como dianas las proteínas NS3/4A, NS5A y NS5B del VHC, por lo que han sido objeto de profundo estudio en los últimos años.

La NS5A es una proteína no estructural multifuncional expresada en una forma basalmente fosforilada (p56) y en otra hiperfosforilada (p58), cuya función en el ciclo de vida del VHC no está totalmente definida. Sin embargo, se sabe que es un componente esencial del complejo de replicación viral y su interacción con el ARN y otras proteínas es crucial para la replicación del virus, además de participar en el ensamblaje del virión. También cabe mencionar que el estado de fosforilación de NS5A es fundamental para que la proteína lleve a cabo sus funciones.

Los fármacos inhibidores de NS5A comercializados hasta el momento son Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir, Elbasvir y Velpatasvir. Todos presentan una estructura muy similar y sus modos de acción están todavía en estudio. El primer inhibidor que pasó a ensayos clínicos fue Daclatasvir, cuya ruta sintética y forma final están patentadas. Estos inhibidores nunca se administran en monoterapia, se combinan con la terapia clásica o con otros AADs, logrando una menor duración del tratamiento, mayor eficacia y mayor seguridad.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Introducción a la Hepatitis C

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una pandemia y una de las principales causas de hepatopatía crónica, pudiendo producir cirrosis, enfermedad hepática terminal y hepatocarcinoma¹. Se ha denominado la epidemia silenciosa, ya que la mayoría de las infecciones son asintomáticas pero en más de un 80% de los casos el virus persiste provocando que muchas personas infectadas con el VHC no sean conscientes de su infección². La infección por el VHC es la primera causa de trasplante hepático y se encuentra como la principal causa de muerte en el mundo por agentes infecciosos, incluso por delante de la infección por el VIH.

De acuerdo a las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, el 3% de la población mundial está infectada (aproximadamente entre 170 y 200 millones de personas), correspondiendo 4 millones a EEUU y unos 5 millones a Europa. La prevalencia varía según los distintos países, su grado de desarrollo o, incluso, las diferentes zonas y circunstancias sanitarias dentro del mismo país. En España se considera que la población infectada oscila en torno al 2,5%. Alrededor del 80% de los infectados evolucionan a la cronicidad, entre un 10% y un 20% desarrollan una cirrosis en un plazo de unos 20 años y anualmente el 2% de los pacientes desarrollan un hepatocarcinoma^{1,3}.

Epidemiología - Prevalencia mundial

- Prevalencia mundial 170 - 200 millones
 - Alrededor de 10.000 muertes/año en U.S.A.
 - Número de muertes esperadas se incrementaran 2-3 veces en el año 2030
- En España: 1,6-2,6%.
 - Mas de 750 mil personas.
 - ↑ con edad >30 años.
 - Transf, UDVP, hospitalización

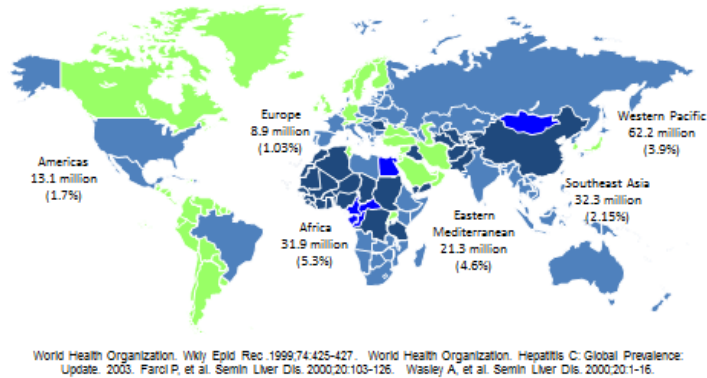


Figura 1: Epidemiología y prevalencia mundial del VHC⁴.

Estructura y genoma del VHC

El VHC pertenece al género Hepacivirus de la familia Flaviviridae, se trata de un virus pequeño (con unos 50 nm de diámetro aproximadamente) y envuelto. El genoma del VHC está constituido por una única molécula de ARN, de polaridad positiva. Tiene una estructura pleomórfica, con las glucoproteínas E1 y E2 incrustadas en la membrana lipídica derivada del retículo endoplasmático de la célula huésped. Bajo la membrana lipídica se encuentra la nucleocápsida, compuesta por múltiples copias de la proteína core rodeando al ARN genómico³.

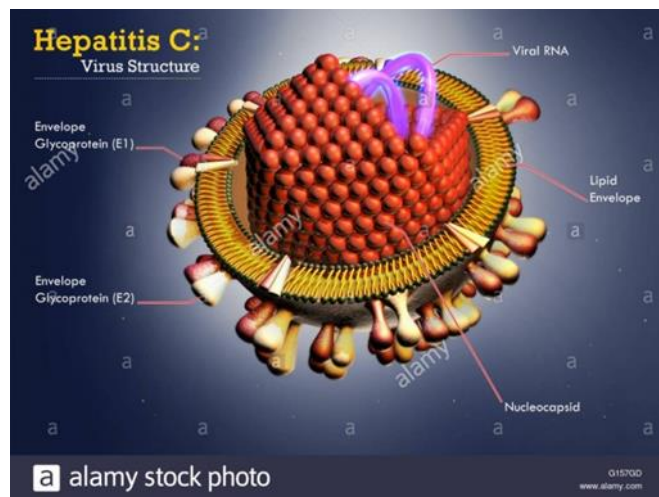


Figura 2: Estructura del VHC⁵.

La expresión de su genoma da lugar a una única poliproteína de unos 3000 aminoácidos. Esta poliproteína es procesada y da lugar a diez proteínas: tres proteínas

estructurales (core, E1 y E2), y siete proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B)².

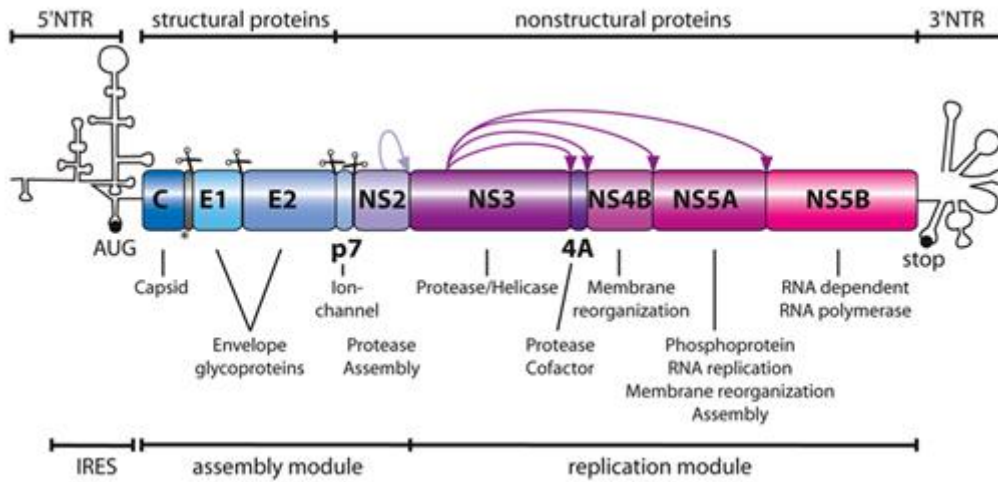


Figura 3: Proteínas del VHC y sus funciones.

(IRES: Internal Ribosome Entry Site o Sitio Interno de Entrada al Ribosoma)

Las funciones que desempeñan las proteínas virales son:

- Proteína core: es la encargada de formar la nucleocápsida.
- Glucoproteínas E1 y E2: están glicosiladas y forman la envoltura del virus, y junto al core son los principales componentes de la partícula vírica.
- Proteína p7: es un polipéptido esencial para la infección productiva in vivo y presenta actividad de canal iónico.
- NS2-3: es una cisteína-proteasa que corta entre las proteínas NS2 y NS3 durante el procesamiento de la poliproteína.
- NS3/4A. NS3 es una proteína multifuncional con actividad serina-proteasa localizada en el tercio N-terminal, que se activa gracias a la interacción con el cofactor de proteasa NS4A. Además presenta actividad ARN helicasa localizada en los dos tercios C-terminales.
- NS4B: es una proteína cuya función no se conoce muy bien. Se sabe que induce la reorganización de la red membranosa o complejo replicativo formado durante la replicación del virus y compuesto por membranas del retículo endoplásmico y gotas lipídicas.
- NS5A: es una fosfoproteína que puede encontrarse en dos formas: básicamente fosforilada o hiperfosforilada. Interviene en la replicación del ARN viral y en el ensamblaje del virión y probablemente su estado de fosforilación sea un modulador clave en la eficiencia de la replicación.

- NS5B: es una proteína ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) con la estructura de mano derecha, con dedos, palma y pulgar³.

La variabilidad genética es una de las características biológicas más relevantes del VHC. Mediante el análisis comparativo de las secuencias genómicas de virus aislados en diferentes zonas geográficas se han podido identificar hasta 7 genotipos distintos del VHC, denominados del 1 al 7 según el orden de descubrimiento. Los distintos genotipos difieren entre sí en un 30-35% de los nucleótidos. Asimismo, cada uno de estos genotipos está dividido en subtipos, los cuales difieren entre sí en un 20-25% de la secuencia de nucleótidos y son identificados mediante letras, por ejemplo, 1 a, 1 b, 2 a, 2 b, 3 a, etc. Debido a esta gran variabilidad, el tratamiento profiláctico para prevenir la infección por VHC se ha encontrado con limitaciones y por ahora no hay una vacuna a la vista^{2,3}.

Las infecciones del genotipo 1 se extienden por todo el mundo. Por el contrario, los virus genotipo 2 y genotipo 3 son más frecuentes en los países industrializados, en América del Sur y en Asia, mientras que los genotipos 4-6 están limitados a otros países principalmente africanos².



Figura 4: Genotipos del VHC y su localización⁶.

Ciclo de replicación del VHC.

El VHC se replica mayoritariamente en el citoplasma de los hepatocitos, aunque también puede infectar otros compartimentos o tipos celulares como células dendríticas, linfocitos B o el sistema nervioso central. El mecanismo exacto de cómo el VHC alcanza el citoplasma e inicia la replicación no se conoce, pero se sabe que circula libre o asociado a lipoproteínas. Estas lipoproteínas ayudan a que la partícula viral difunda a través de las células endoteliales, o sea capturada y transportada por las lectinas tipo C hasta los hepatocitos. El VHC necesita diversos receptores con diferente localización en la membrana celular, haciendo que la entrada del VHC sea un proceso complejo y muy regulado, pero que a su vez ofrece un gran número de posibles dianas terapéuticas.

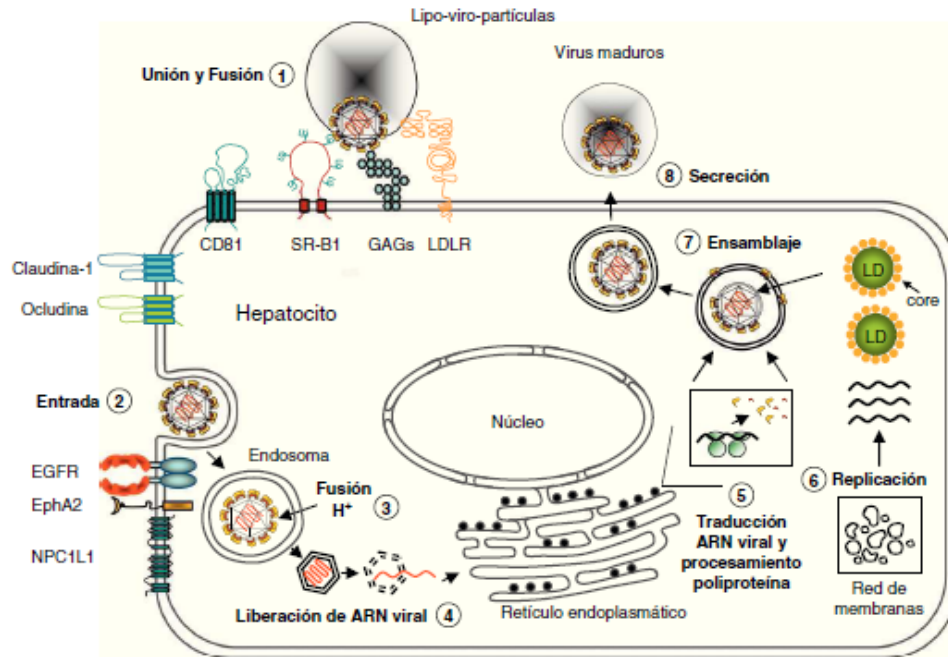


Figura 5: Representación gráfica del ciclo de vida del VHC³.

- 1) La interacción inicial del virión con la membrana celular está mediada por glucosaminoglucanos (GAGs) como el heparán sulfato, que ayudan a concentrar el virus en la superficie celular. A continuación, el VHC interacciona de manera secuencial con los receptores de LDL, SR-B1 (scavenger B1), CD81 (tetraspanina), claudina-1 y ocludina. Los receptores tirosina cinasa, EGFR (epidermal growth factor receptor) y EphA2 (ephrin type-A receptor 2) son cofactores de la entrada del VHC ya que regulan la asociación entre CD81 y claudina-1 y la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática. Además, se ha demostrado que el receptor NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like1), implicado en la absorción intestinal de colesterol, también tiene un papel en la entrada del VHC, posiblemente en la fusión de las membranas viral y celular.
- 2) La entrada en el hepatocito se produce por endocitosis dependiente de clatrina.
- 3) La fusión de la envuelta del virus con la membrana del endosoma es un proceso mediado por la acidificación del endosoma.
- 4) Desencapsidación y liberación del ARN viral.
- 5) Traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína por proteasas virales y del huésped.
- 6) Replicación del ARN viral en el complejo de replicación, asociado a la red de membranas.
- 7) Formación de la cápsida y ensamblaje de los nuevos viriones. El ensamblaje tiene lugar cerca de gotas lipídicas, en las que se va acumulando la proteína core. La proteína NS5A, que se une intrínsecamente al ARN, podría liberarse del complejo replicativo a

la superficie de las gotas lipídicas, interaccionar con el core y transportar así el ARN a la proteína core, desencadenando la formación de la nucleocápsida.

8) Las partículas del VHC se asocian a lipoproteínas y son liberadas a través de la vía de secreción celular^{3,7}.

Introducción a la terapia: tratamientos antiguos y nuevos (AADs)

La terapia tradicional contra la hepatitis C se basa en la combinación de inyecciones regulares de interferón alfa pegilado (peg-IFN- α) y dosis orales diarias de ribavirina (RBV).

El interferón pegilado α es un conjugado covalente formado por la unión de interferón al polímero polietilenglicol (PEG). Ejerce efectos antivirales aumentando la producción y liberación de enzimas específicas como la proteína quinasa, que contribuyen a la inhibición de la replicación viral, mediante la activación de endorribonucleasas que escinden el ARN viral impidiendo su traducción en proteínas virales. Existen dos tipos de interferones pegilados alfa unidos a moléculas de polietilenglicol de distintos tamaño y configuración^{8,9}.

La Ribavirina (RBV) pertenece a una clase de medicamentos antivirales llamados análogos de nucleósidos. Se trata de un análogo de nucleósido de guanina que actúa alterando el metabolismo celular de las purinas, inhibe la inosina monofosfato deshidrogenasa y produce una disminución en la síntesis de guanosina trifosfato (GTP), lo que conduce a la inhibición del ARN viral y de la síntesis de proteínas virales. Requiere una activación hasta el producto trifosforilado por fosfoquinasas celulares¹⁰.

Dado que este tratamiento tiene una eficacia limitada, en el año 2011 aparecen los antivirales de acción directa (AADs) aprobados para su uso en pacientes infectados por VHC en combinación con la terapia clásica, aumentando así la respuesta al tratamiento³. Los AADs se clasifican en función de la diana sobre la que actúan:

- Inhibidores de la polimerasa NS5B.

La polimerasa viral NS5B es la responsable de la replicación viral. Existen 2 tipos de inhibidores de la polimerasa: los análogos de nucleósidos y los no nucleósidos. En general, los análogos de nucleósidos son activos contra múltiples genotipos debido a que se unen al sitio activo de la polimerasa y este está muy conservado entre genotipos. Por el contrario, los inhibidores no nucleósidos son inhibidores alostéricos, por lo que aparentemente son más dependientes del genotipo viral³.

El fármaco más conocido de este grupo es Sofosbuvir, un análogo de nucleósido que actúa inhibiendo de forma selectiva la polimerasa NS5B, bloqueando el ciclo de replicación del VHC. Sofosbuvir es un profármaco del 2-desoxi-2-fluoro-2-C-metiluridina monofosfato, que requiere una transformación en el

interior de los hepatocitos para activarse, desencadenando así la terminación de la replicación del genoma viral¹¹.

- Inhibidores de la proteasa NS3/4A.

En 2011 se aprobaron 2 inhibidores de la proteasa viral, Boceprevir y Telaprevir, para el tratamiento de la infección por el VHC en combinación con pegIFN y Ribavirina. Estos fármacos son peptidomiméticos y se unen al aminoácido serina de la proteasa NS3/4A de manera covalente pero reversible. Con esta triple terapia, la respuesta virológica sostenida aumentó de forma significativa en pacientes infectados por el VHC de genotipo 1. Sin embargo, este tratamiento es menos efectivo contra los genotipos no 1 y conlleva la aparición de efectos secundarios graves. Más tarde a finales del año 2013 se comercializaron los inhibidores de proteasa de segunda generación, dirigidos a disminuir los efectos adversos y a ampliar el espectro de eficacia. Entre ellos cabe destacar Simeprevir, un peptidomimético macrocíclico^{3, 11}.

- Inhibidores de la NS5A.

La proteína NS5A es esencial para la propagación del virus y aunque no se conocen del todo sus funciones concretas, interviene en la regulación de la replicación del genoma vírico y en el ensamblaje del virión. La proteína es extremadamente sensible a pequeñas moléculas inhibitorias, que probablemente sean las moléculas antivíricas descubiertas más potentes, presentando actividad frente a distintos genotipos del VHC con una sola dosis diaria³. Los fármacos inhibidores comercializados son Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir, Elbasvir y Velpatasvir, son bastante similares y están diseñados para interactuar con cada monómero de la proteína¹².

El primer inhibidor de NS5A, Daclatasvir, ha demostrado ser un antiviral potente in vitro e in vivo, siendo capaz de incrementar la actividad antiviral del pegIFN y la ribavirina³. El objetivo de este trabajo es profundizar en el conocimiento de esta proteína NS5A y el fármaco Daclatasvir.

Otras posibles dianas para nuevos tratamientos serían:

- Las proteínas E1 y E2 de la envuelta del virus. La infección por el VHC se puede impedir mediante el uso de anticuerpos neutralizantes contra estas proteínas. Estos anticuerpos neutralizantes han demostrado ser muy potentes al neutralizar cepas de diferentes genotipos in vitro, pero su eficacia in vivo es mucho menor. Esto se podría deber por un lado a la gran variabilidad genética del VHC, sobre todo en las glucoproteínas de la envuelta, por lo que se requerirían anticuerpos neutralizantes de amplio espectro. Por otro lado, el virus circula asociado a lipoproteínas que podrían enmascarar los epítomos neutralizantes. Finalmente, el VHC también puede infectar a las células vecinas mediante transmisión célula a célula, escapando así de la neutralización por los anticuerpos neutralizantes.
- Los receptores de entrada del VHC CD81, SR-B1 y claudina-1. El bloqueo de estos receptores ha demostrado ser eficaz tanto in vitro como in vivo (en

ratones), independientemente del genotipo del VHC. El uso de inhibidores de la entrada tiene especial interés para impedir la recurrencia de la hepatitis C en pacientes que han recibido un trasplante hepático.

- La proteína no estructural NS4B. Esta proteína es esencial para la replicación viral y la formación de los complejos de replicación. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual ejerce su función, NS4B también podría representar una posible diana terapéutica contra la infección por el VHC³.

OBJETIVOS

1. Conocer una visión general del virus de la hepatitis C (su epidemiología, su estructura y genoma, y las etapas de su ciclo de vida).
2. Conocer la evolución del tratamiento frente a la hepatitis C, desde la terapia clásica hasta los antivirales de acción directa (AADs).
3. Conocer la diana sobre la que actúan los nuevos antivirales contra el VHC.
4. Estudiar lo que se conoce de la estructura de la proteína NS5A y cómo va a servir de diana para los fármacos antivirales.
5. Conocer la estructura y el mecanismo de acción del inhibidor de la proteína NS5A Daclatasvir para el tratamiento de la hepatitis C.
6. Estudiar y comprender la ruta sintética del fármaco Daclatasvir.

METODOLOGÍA

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos y editoriales como Pubmed, Google Académico y Elsevier para obtener información acerca del tema tratado. Se ha realizado una revisión de diferentes artículos y se ha elaborado una recopilación de los datos encontrados y contrastados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROTEÍNA NS5A. ¿Qué se conoce de ella? Estructura y actividad.

La proteína no estructural 5A del VHC (NS5A) es una proteína multifuncional de unos 447 aminoácidos, expresada en una forma basalmente fosforilada (p56) y en otra hiperfosforilada (p58)¹³. Se trata de una metaloproteasa dependiente de zinc, cuya función en el ciclo de vida del VHC no está claramente definida. Sin embargo, diversos estudios demuestran que, además de desempeñar un papel importante en la replicación viral y en la producción de partículas infecciosas, interacciona con un gran número de proteínas celulares, regulando diversas vías de señalización¹².

Presenta 3 dominios estructurales (I, II, III) que dan lugar a cuatro regiones funcionales complementarias (A, B, C y D) y su extremo N-terminal contiene una hélice.

Por un lado, el dominio I es un dímero que coordina un átomo de zinc, se une al ARN *in vitro* y es esencial para la replicación del ARN viral. Se trata del dominio más estudiado de la proteína NS5A y se cree que desempeña múltiples funciones en el ensamblaje, uniendo el ARN genómico y transportándolo a las gotitas de lípidos donde se transfiere al núcleo. También contribuye a un cambio en la morfología de las gotas de lípidos, aumentando su tamaño^{14, 15}.

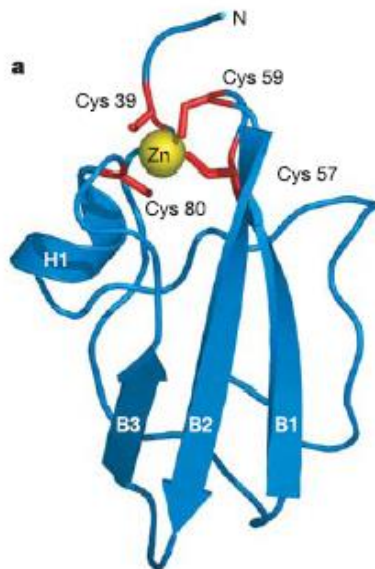


Figura 6: Dominio I de NS5A con el átomo de Zn coordinado¹⁶.

Por otro lado, el dominio II interactúa con varias proteínas celulares, incluida la ciclofilina A; y por último, el dominio III es importante para el ensamblaje y la secreción del virión, aunque tanto el II como el III están menos caracterizados.

Las regiones A, B y C se requieren para la replicación del ARN viral y la región D está asociada con el ensamblaje del virión¹⁷. Las regiones centrales y las C-terminales de la proteína son importantes para la fosforilación basal, mientras que la hiperfosforilación probablemente ocurre en uno o más residuos de serina ubicados dentro del linker entre los dominios I y II¹³. El dominio N-terminal de NS5A forma una plataforma que está involucrada en interacciones específicas proteína-proteína esenciales para el montaje del complejo de replicación¹⁸.

NS5A no tiene una actividad enzimática reconocida como otras dianas de fármacos virales (proteasa, polimerasa); sin embargo, como participa en varias etapas del ciclo de vida del VHC e interactúa con otras proteínas virales y celulares despierta gran interés para su estudio¹⁷. Además es un componente esencial del complejo de replicación viral, y se cree que su interacción con el ARN viral y otras proteínas NS es crucial para la replicación del virus¹⁸.

La eliminación de la región N-terminal o la unión de NS4A a NS5A induce un cambio conformacional en NS5A que afecta a su estado de fosforilación pasando de p56 a p58.

La vida media de la NS5A hiperfosforilada es de unas 7 h aproximadamente, siendo mucho más corta que la de la forma fosforilada basal de unas 16 h, la más estable entre las proteínas no estructurales del VHC¹⁷. Según varios estudios, se sabe que los dominios NS5A II y III no son necesarios para la hiperfosforilación o para el efecto de los inhibidores en la hiperfosforilación¹³.

La fosforilación de la proteína NS5A es esencial en la replicación del genoma y en el paso inicial del ensamblaje del virión del virus de la hepatitis C. En las células infectadas por el VHC, NS5A se fosforila basalmente por quinasas celulares tales como la quinasa II o la proteína quinasa A (PKA) inmediatamente después de completar el procesamiento proteolítico de la poliproteína precursora. El NS5A fosforilado basalmente se fosforila adicionalmente por la caseína quinasa I- α o la quinasa Polo-like 1 para generar la forma hiperfosforilada. Las fosfoisoformas de NS5A junto con otras proteínas no estructurales y factores celulares del huésped, forman el complejo de replicación viral, una estructura especializada protegida por membranas celulares, que inicia la síntesis del ARN viral. NS5A tiene la capacidad de unirse al ARN del VHC, y NS5A hiperfosforilada recluta ARN viral recién sintetizado a las estructuras de membrana de baja densidad alrededor de las gotas de lípidos, posibles sitios para la formación de la nucleocápsida. La interacción de NS5A con Core es importante para este paso. El estado de fosforilación de NS5A se considera que tiene un impacto significativo en su función y en el ciclo de vida del VHC (Figura 7)¹⁸.

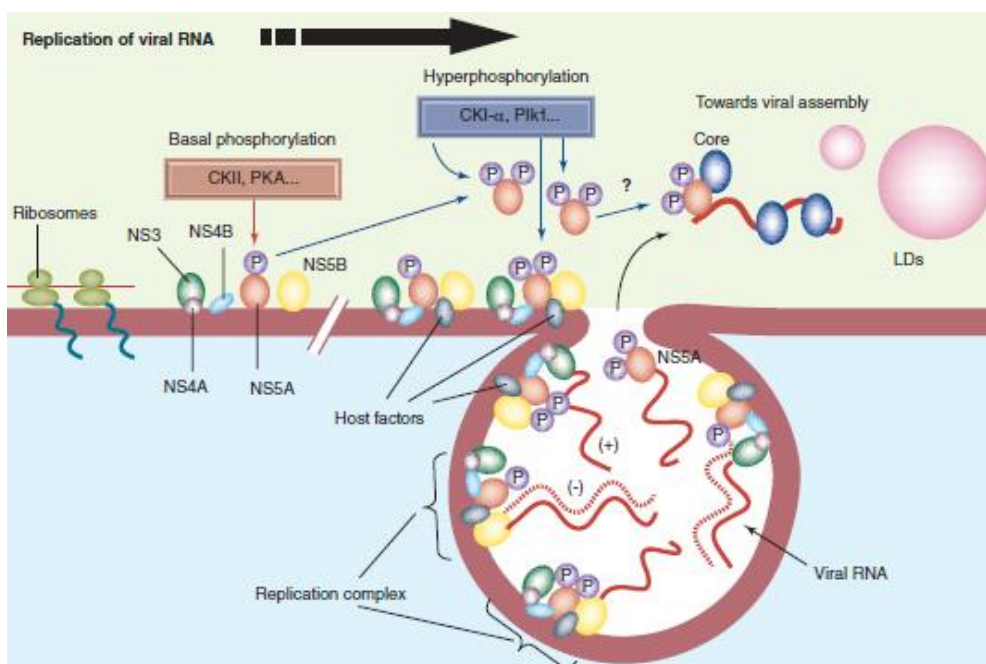


Figura 7: Modelo propuesto para la implicación de la fosforilación de NS5A en la replicación del genoma y en el ensamblaje del virión del VHC¹⁸.

INHIBIDORES DE LA FUNCIÓN DE LA NS5A. DACLATASVIR (DCV)

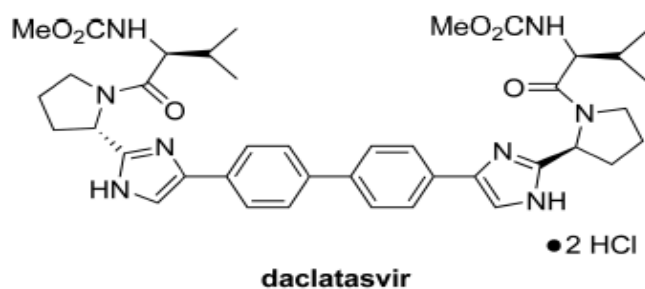


Figura 8: molécula de Daclatasvir.

Actualmente se ha añadido al arsenal terapéutico de inhibidores del VHC una nueva clase de DAAs. Se trata de moléculas cuya diana es la proteína NS5A del virus VHC. La disponibilidad de inhibidores NS5A clínicamente eficaces ha proporcionado herramientas útiles para estudiar los papeles de la proteína NS5A en el ciclo de vida del VHC y los modos de inhibición. El primer inhibidor del complejo de replicación NS5A para demostrar la eficacia en la clínica fue daclastavir (DCV, BMS-790052), fármaco en el que voy a centrar mi revisión.

¿Cómo actúa?

Los estudios publicados han revelado posibles modos de acción para los inhibidores de NS5A:

- Bloquean las funciones de NS5A requeridas para la formación del complejo de replicación viral como la fosforilación.
- Bloquean las vías de señalización de NS5A con otros componentes virales y celulares, amplificando los efectos anti-VHC.
- Redistribuyen a la NS5A del retículo endoplásmico (ER) a la superficie de las gotas de lípidos, modificando el complejo de replicación del VHC activo.
- Inhiben tanto la replicación del ARN como el ensamblaje del virión.
- Bloquean las funciones de los oligómeros de NS5A.

La replicación en las células del VHC se inhibe por una relación de DCV/NS5A estimada en aproximadamente 1/47000, lo que sugiere que un pequeño número de moléculas del inhibidor afecta a la función de un gran número de moléculas de la proteína NS5A¹⁷.

Aunque inicialmente se desarrolló como un inhibidor de la replicación del genoma, ha quedado claro que DCV también tiene un efecto sobre el ensamblaje del virus. El tratamiento de las células infectadas con DCV dio como resultado un bloqueo rápido (2 h) del ensamblaje del virus, que precedió a la inhibición de la replicación del genoma, que solo fue aparente posteriormente en el tiempo (24 h). Se sabe que el DCV tiene

como objetivo el dominio I de la proteína, debido a la ubicación de las mutaciones de resistencia (por ejemplo, L31M e Y93H) y a que el dominio I interviene en el ensamblaje del virus justificando así la rápida inhibición de este proceso¹⁵.

El orden relativo de la barrera de resistencia a daclatasvir es 1b> 4a> 5a> 6a ~ 1a> 2a> 3a, considerando que un genotipo presenta una barrera de resistencia más alta si quedan pocas colonias o ninguna después del tratamiento con DCV, y que un genotipo tiene una barrera de resistencia menor si quedan más colonias después del tratamiento. Daclatasvir tiene el potencial de ser un agente eficaz para los genotipos del VHC del 1 al 6, pero se debe utilizar en terapia combinada. Muestra efectos sinérgicos con interferón alfa, inhibidores de la proteasa NS3, inhibidores no nucleósidos de la NS5B y análogos nucleósidos de la NS5B¹⁹.

Ruta sintética de Daclatasvir patentada

Los tres productos de partida son el dibromuro **2**, la Boc-L-prolina, y la L-valina.

La bis-acetofenona **1** tras una reacción de bromación forma el bis-bromuro **2**. A continuación se añade a **2**, la Boc-prolina y se forma el cetoéster **3**, que no se aísla, y se convierte directamente en el bis-imidazol **4**, aislado como una base libre cristalina de alta pureza química y diastereomérica. Después mediante Boc-desprotección con HCl se forma **5**, que está cristalizado como una sal de tetra HCl, y se produce el acoplamiento de amida con la Moc-L-valina, dando lugar así a Daclatasvir (Figura 9).

La ruta de síntesis diseñada inicialmente constaba de una reacción de acoplamiento de Suzuki para generar el sintón bifenilo.

Sin embargo en la optimización de esta síntesis para uso industrial, se inicia la ruta con la bis-acetofenona **1** comercialmente disponible, que incorpora el resto bifenilo, evitando de este modo una etapa tardía de acoplamiento con los consiguientes problemas asociados a la eliminación de Pd y a la necesidad de eliminar los residuos de ácido borónico, considerados potenciales impurezas genotóxicas a niveles de partes por millón (ppm). Una mejora clave fue el descubrimiento de que el bis-imidazol **4** podía formarse desde el correspondiente cetoéster **3** en lugar de la cetoamida, una reacción que fue de mayor rendimiento y utilizó materiales más simples. Esta reacción se ha utilizado desde entonces para formar el resto de imidazol común en muchos inhibidores de NS5A, incluidos Ledipasvir y Velpatasvir.

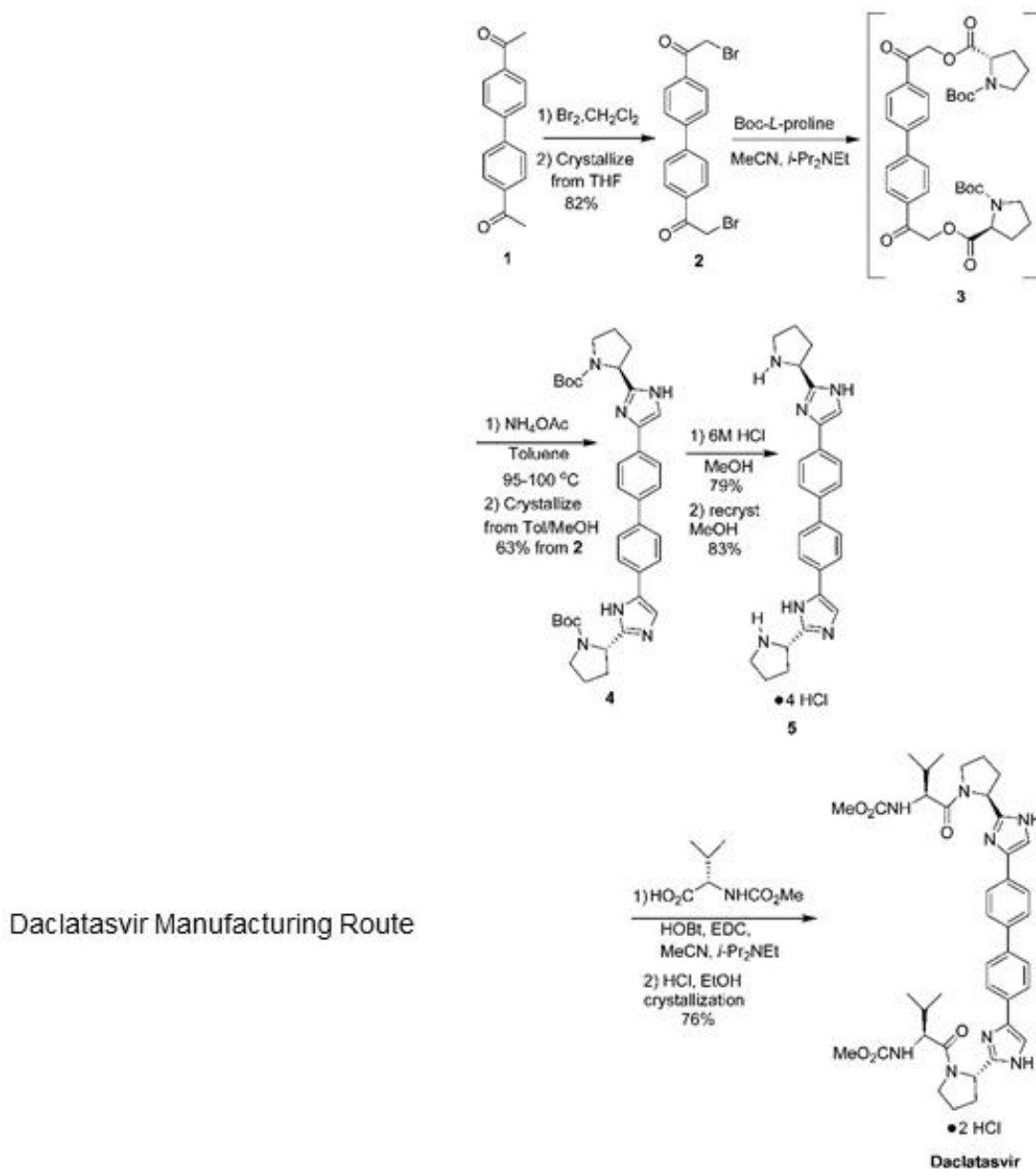


Figura 9: ruta sintética de DCV patentada¹².

Un polimorfo de la sal cristalina de bis-HCl, denominada forma N-2, que se cristaliza en etanol, está patentada como forma final de Daclatasvir. Se trata del polimorfo termodinámicamente más estable. Daclatasvir pertenece a la Clase 2 del *Sistema de Clasificación Biofarmacéutica* (BCS) con baja solubilidad, alta permeabilidad y una biodisponibilidad absoluta del 67%. Los comprimidos recubiertos con película de liberación inmediata de 30 mg y 60 mg aprobados, son fabricados usando un proceso de granulación en seco¹².

Combinaciones con otros fármacos en el tratamiento

Daclatasvir se comercializa actualmente bajo el nombre de Daklinza[®], tras haber superado diversos ensayos clínicos en combinación con otros agentes AADs y/o regímenes de interferón- α pegilado/Ribavirina²⁰.



Asunaprevir (inhibidor proteasa NS3/4A) (200 mg, una o dos veces al día) más Daclatasvir (60 mg, una vez al día) más interferón/Ribavirina lograron una tasa de RVS12 (Respuesta Viral Sostenida en 12 semanas) del 95% en los respondedores nulos del genotipo 1 del VHC. Mientras que en pacientes japoneses, intolerantes a interferón, Daclatasvir más Asunaprevir lograron una RVS24 (Respuesta Viral Sostenida en 24 semanas) del 87,4%¹⁹. Con esto se podría decir, que los nuevos fármacos están desplazando al interferón y a la ribavirina de la terapia habitual.

Por otro lado, una triple combinación de Daclatasvir, Asunaprevir y el inhibidor de la polimerasa NS5B Beclavubir superó los ensayos clínicos de evaluación para el tratamiento de sujetos infectados con VHC del genotipo 1a y 1b, con resultados preliminares alentadores (RVS12 del 92%)²⁰.

La combinación de Sofosbuvir y Daclatasvir es efectiva en pacientes no tratados previamente, así como en aquellos tratados con Telaprevir o Boceprevir, y dio lugar a una RVS de 98%, 92% y 89% en los pacientes con genotipos 1, 2 y 3, respectivamente.

Otra combinación sería: Sofosbuvir (400 mg) en una combinación de dosis fija, denominada Harvoni[®], con Ledipasvir (90 mg), la cual provocó una RVS12 del 95%, o incluso del 100%, en infecciones por el genotipo 1 del VHC, un rendimiento que difícilmente podría mejorarse, a menos que la duración total del tratamiento se redujera de 12 a 8 semanas. El tratamiento de 8 semanas proporcionó una respuesta virológica sostenida del 94%, en comparación con el 95% durante 12 semanas de tratamiento.

La combinación de Grazoprevir (MK-5172) (inhibidor proteasa NS3/4A) y Elbasvir (MK-8742), con o sin Ribavirina, durante 12 semanas en pacientes con mono infección por genotipo 1 de VHC y coinfección por VIH / VHC sin cirrosis alcanzó tasas de RVS de 87-98% .

La tasa de RVS12 fue superior al 95% tras el retratamiento de pacientes con genotipo 1 del VHC con Paritaprevir más Ombitasvir más Dasabuvir más Ribavirina (sin interferón). La tasa de RVS12 aumentó hasta 98% si se administró Paritaprevir más Ombitasvir más Dasabuvir más Ribavirina en pacientes con infección por el genotipo 1b del VHC. Gracias a la información proporcionada por estos estudios, parece que la Ribavirina ya no es necesaria, al menos en el tratamiento de la infección por el genotipo 1b del VHC, donde Paritaprevir, Ombitasvir y Dasabuvir lograron una RVS de 99,5% con Ribavirina, en comparación con 99,0% sin Ribavirina. Por lo tanto, en conclusión, Paritaprevir, Ombitasvir y Dasabuvir junto con Ritonavir (antirretroviral contra VIH) lograron una respuesta virológica sostenida casi del 100% sin Ribavirina en pacientes con infección por el VHC genotipo 1b¹⁹ .

CONCLUSIONES

Los avances en el conocimiento de las diferentes etapas del ciclo de vida del VHC han permitido que el desarrollo de terapias contra la infección por el VHC aumente de forma exponencial durante los últimos años. La terapia triple estándar tradicional (pegIFN, Ribavirina y Telaprevir/Boceprevir) ha mejorado sustancialmente la tasa de respuesta de los pacientes infectados por el VHC de genotipo 1. Sin embargo, este tratamiento no es siempre efectivo y a menudo está contraindicado debido a la aparición de efectos adversos en múltiples poblaciones de pacientes. El descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas abrirá nuevas líneas de desarrollo de medicamentos más potentes, capaces de curar a la mayoría o a todos, los pacientes con hepatitis C crónica³.

El desarrollo de medicamentos anti-VHC es una de las historias más exitosas de la terapia antiviral. De hecho, por primera vez en la historia de la humanidad, tenemos el potencial de erradicar una infección viral crónica usando solo agentes antivirales directos administrados por vía oral (AADs).

Debido a la variabilidad del VHC, se requiere una terapia de combinación para dar con los tratamientos más eficaces y obtener: altas tasas de respuesta viral sostenida (RVS) con efectos secundarios mínimos, cobertura pangénomica, una dosis fija con un número mínimo de inhibidores y corta duración. Se han probado muchas terapias de combinación diferentes, sobre todo en pacientes del genotipo 1 ya que es el más frecuente. De acuerdo a varios estudios, un componente esencial para alcanzar el mejor tratamiento incluye un análogo de nucleósido (NUC) como Sofosbuvir (SOF), ya que ofrece una cobertura pangénomica, una barrera de alta resistencia y no presenta problemas de resistencias. También la combinación de un inhibidor de NS5A y un inhibidor de proteasa NS3 da buenos resultados¹⁷ .

Además del impacto clínico que Daclatasvir ha supuesto en el tratamiento de la Hepatitis C, también ha sido útil como herramienta en una serie de estudios dirigido a descifrar las diversas funciones de la proteína NS5A. Estos trabajos también han arrojado algo de luz sobre las razones probables detrás de la alta potencia inhibidora asociada con los compuestos de orientación NS5A^{20, 21}.

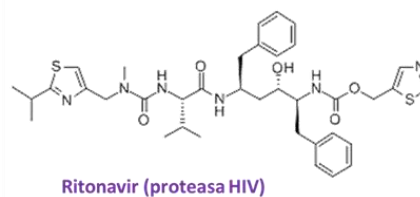
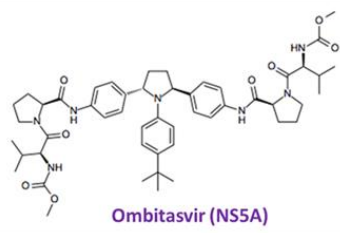
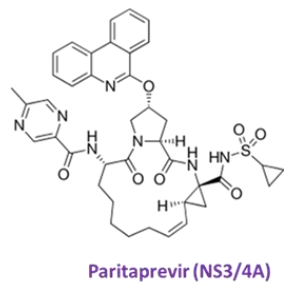
La terapia óptima actual para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C genotipo 1, la cepa más prevalente, es una combinación de interferón- α pegilado y el análogo de nucleósido Ribavirina junto con el inhibidor de la proteasa no estructural 3/4A (NS3/4A) Simeprevir o el inhibidor nucleósido de la polimerasa NS5B Sofosbuvir. Aunque este régimen de medicamentos mejora las tasas de respuesta en comparación a la terapia solo con interferón pegilado- α y Ribavirina, es difícil de tolerar debido a numerosos efectos secundarios, algunos de los cuales presentan un desafío significativo²⁰.

Existen muchas combinaciones nuevas que están resultando efectivas para el tratamiento de la infección por el VHC, entre las que destacan principalmente:

- Harvoni[®] (Ledipasvir y Sofosbuvir): fue la primera combinación aprobada en octubre de 2014 por la FDA para tratar la infección crónica por el genotipo 1 del VHC y el primer régimen que no requería la administración de interferón o ribavirina²².



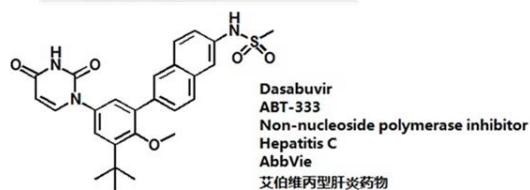
- Viekirax[®] (Ombitasvir, Paritaprevir, Ritonavir): la dosis recomendada es de dos comprimidos de 12,5 mg/75 mg/50 mg una vez al día, acompañados de alimentos²³.



- Exviera[®] (Dasabuvir) más Viekirax[®]^{23, 24}.



Aprobado en España el uso de la combinación de Exviera-Viekirax (2015)



BIBLIOGRAFÍA

1. <http://epidemiologiamolecular.com/virus-hepatitis-vhc/>
2. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11(7):482-96.
3. Koutsoudakis G, Forns X, Pérez-del-Pulgar S. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterología y Hepatología.* abril de 2013; 36(4):280-93.

4. <https://i0.wp.com/epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2012/12/image5.png>
5. <http://www.alamy.com/stock-photo-hepatitis-c-virus-infographic-illustration-103992573.html>
6. https://i1.wp.com/epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2012/12/clip_image0026.gif
7. Troels K H Scheel y Charles M Rice. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.* 2013; 19(7): 837-849.
8. Buti M. ¿Es el tipo de interferón pegilado importante en la respuesta al tratamiento de la hepatitis crónica C? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* marzo de 2008; 26(3):125-6.
9. Agencia Europea del Medicamento. Ficha técnica del producto Pegasys® (PEG-interferón-alfa 2a) disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000395/WC500039195.pdf
10. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Ficha técnica de Ribavirina Normon disponible en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/73658/FT_73658.html.pdf
11. Jimenez Galan R. Nuevos fármacos en el abordaje terapéutico de la hepatitis C. *Farmacia Hospitalaria.* 1 de mayo de 2014;(3):231–247.
12. D. L. Hughes; Patent Highlights: Recently Approved HCV NS5A Drugs *Org. Process Res. Dev.*; 2016; (20) 1404-1415.
13. Qiu D, Lemm JA, O'Boyle DR, Sun J-H, Nower PT, Nguyen V, et al. The effects of NS5A inhibitors on NS5A phosphorylation, polyprotein processing and localization. *J Gen Virol.* 1 de noviembre de 2011; 92(11):2502-11.
14. Yin C, Goonawardane N, Stewart H, Harris M. A role for domain I of the hepatitis C virus NS5A protein in virus assembly. Randall G, editor. *PLOS Pathogens.* 19 de enero de 2018; 14(1):e1006834.
15. 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: Crystal structure of HCV genotype 1a NS5A domain 1. *Protein Sci.* junio de 2014; 23(6):723-34.
16. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature.* 2005;435(7040):374-9.
17. Gao M, O'Boyle DR, Roberts S. HCV NS5A replication complex inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology.* octubre de 2016;30:151-7.
18. Masaki T, Suzuki T. NS5A phosphorylation: its functional role in the life cycle of hepatitis C virus. *Future Virology.* 2015; 10(6):751-62.
19. De Clercq E. Development of antiviral drugs for the treatment of hepatitis C at an accelerating pace: Treatment of hepatitis C accelerating. *Rev. Med. Virol.* 2015;25(4):254-67.

20. Belema M, Nguyen VN, Bachand C, Deon DH, Goodrich JT, James CA, et al. Hepatitis C Virus NS5A Replication Complex Inhibitors: The Discovery of Daclatasvir. *J. Med. Chem.* 2014; 57(5):2013-32.
21. Agencia Europea del Medicamento. Ficha técnica del producto Daklinza[®] (Daclatasvir) disponible en:
http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003768/WC500172848.pdf
22. Agencia Europea del Medicamento. Ficha técnica del producto Harvoni[®] (Ledipasvir, sofosbuvir) disponible en:
http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003850/WC500177995.pdf
23. Agencia Europea del Medicamento. Ficha técnica del producto Viekirax[®] (Ombitasvir, paritaprevir, ritonavir) disponible en:
http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003839/WC500183997.pdf
24. Agencia Europea del Medicamento. Ficha técnica del producto Exviera[®] (Dasabuvir) disponible en:
http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003837/WC500182233.pdf