



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA
FRENTE AL VHC: DIANAS Y MECANISMOS DE
ACCIÓN

Autor: Pilar Merino García

Fecha: Junio 2019

Tutor: María Loreto Salazar Martínez de Pisón

ÍNDICE.

1. RESUMEN.
2. INTRODUCCIÓN.
 - 2.1. Clínica, epidemiología y antecedentes de tratamiento.
 - 2.2. Virus de la hepatitis C.
 - A) Genoma y proteínas.
 - B) Variabilidad genética.
 - C) Ciclo de replicación.
3. OBJETIVOS.
4. METODOLOGÍA.
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.
 - 5.1. Antivirales de acción directa disponibles actualmente.
 - A) Inhibidores de NS3/4A.
 - B) Inhibidores de NS5A.
 - C) Inhibidores de NS5B.
 - Inhibidores análogos de nucleós(t)idos (NIs).
 - Inhibidores no nucleos(t)ídicos (NNIs).
 - 5.2. Otros fármacos en desarrollo y potenciales dianas.
 - A) Dianas virales alternativas.
 - Proteína no estructural p7.
 - Proteínas estructurales E1 y E2.
 - Proteína no estructural NS4B.
 - B) Inmunomoduladores/inhibidores de proteínas celulares del hospedador.
 - Inhibidores de la ciclofilina A.
 - Inhibidores del miR-122.
 - Otros HTA.
6. CONCLUSIONES.
7. BIBLIOGRAFÍA.

1. RESUMEN.

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa causada por un virus que recibe el mismo nombre, el “virus de la hepatitis C” (VHC). La probabilidad de que cronifique y tenga consecuencias más severas (como cirrosis o hepatocarcinoma) es elevada, y afecta a millones de personas en todo el mundo. La obtención de un tratamiento eficaz que cure la infección es vital para su control y posible erradicación, y para ello hay que tener un conocimiento detallado del virus y su ciclo de replicación. Se trata de un pequeño virus envuelto de la familia *Flaviviridae* y su genoma es una cadena de ARN (+) lineal, que codifica para distintas proteínas estructurales (core, E1, E2) y no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). El estudio de estas proteínas y la función que desempeñan en el ciclo vital es la base del desarrollo de los nuevos antivirales. Actualmente, la terapia consiste en la administración de antivirales de acción directa (AADs) dirigidos a la proteasa NS3/4A, la proteína NS5A, y la polimerasa NS5B, pero no hay que olvidar que existen otras dianas potenciales tanto del virus, como del hospedador para las que se podrían diseñar nuevos fármacos. En esta revisión bibliográfica se recoge la descripción de las dianas frente a las que se dirigen los antivirales de la hepatitis C, y el desarrollo y mecanismo de acción de estos.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

2.1. Clínica, epidemiología y antecedentes de tratamiento.

La hepatitis C es una enfermedad inflamatoria hepática de carácter infeccioso, ocasionada por el VHC, cuya transmisión es fundamentalmente parenteral. Esta infección se puede expresar de forma aguda y crónica¹. La infección aguda no suele presentar síntomas (70-85%), por ello, es habitual que no sea diagnosticada².

En torno al 15-25% de los pacientes infectados experimenta una curación clínica espontánea (sin recibir tratamiento) pasados 6 meses. Esto implica que, aproximadamente, el 80% de los casos deriva en hepatitis C crónica. Se trata de un proceso lento que sin el diagnóstico y tratamiento adecuados puede desencadenar fibrosis, y posteriormente cirrosis y carcinoma hepático, tras pasar inadvertido durante décadas².

Algunos estudios indican que se producen de 3 a 4 millones de nuevas infecciones cada año³. A nivel mundial hay 71 millones de infecciones crónicas y alrededor de 400.000 defunciones/año, siendo mayor la prevalencia en el Mediterráneo Oriental (2,3%) y en Europa (1,5%). Dada la magnitud del problema, se explica la importancia del diseño de nuevos fármacos para su tratamiento¹.

Hasta hace poco, este consistía en terapias combinadas no específicas de pegIFN- α y ribavirina (RBV). Dichas terapias contaban con numerosos efectos adversos, los tratamientos eran prolongados (unas 48 semanas) y las tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) eran bajas (40-50%)⁴.

En 2011 surgieron los primeros AADs, los inhibidores de la proteasa boceprevir y telaprevir, que mejoraron la RVS para el genotipo 1 en combinación con pegIFN- α y RBV, pero seguían asociados a una baja tolerabilidad y a eventos adversos graves. Después, han ido apareciendo nuevos AADs, que combinados, admiten regímenes libres de interferón, con

menos contraindicaciones, una alta tolerancia, y tasas de RVS de hasta un 90% que se consiguen en periodos de 8 a 24 semanas^{4, 5}.

Los avances en el tratamiento han derivado del estudio en profundidad del virus.

2.2. Virus de la hepatitis C.

El VHC pertenece al género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Su diámetro es de unos 68nm (oscila entre 45-86nm) y el material genético se encuentra en forma de ARN (+) monocatenario lineal, con una longitud de unas 9,6 kb (kilo bases)^{6, 7}.

A) Genoma y proteínas.

Está organizado de la siguiente manera: posee un amplio ORF (*open reading frame*) en cuyos extremos localizamos 5' y 3' UTR (*untranslated regions*), que son fundamentales en la replicación. Además, existe un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en 5'UTR, que es donde comienza la traducción del ARN. Al traducir el ORF se genera una poliproteína que será procesada co- y post-traduccionalmente en 3 proteínas estructurales y otras 7 no estructurales^{8, 9}.

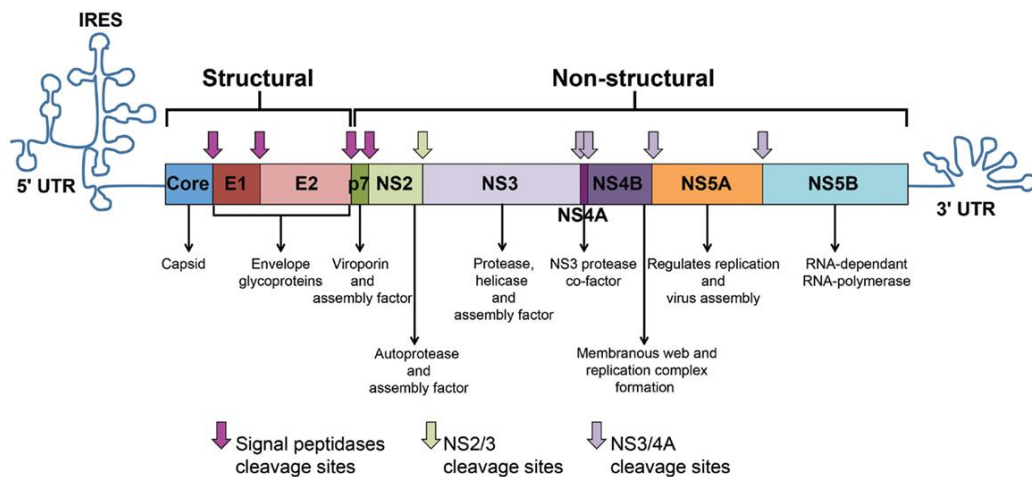


Figura 1. Genoma del VHC y poliproteína⁹.

- Estructurales:

- Core: es esencial en la formación de la nucleocápside, la cual permite la encapsulación del ARN viral⁶.
- E1 y E2: son glicoproteínas que constituyen la envoltura del virus e interaccionan con los receptores celulares para que se produzca la entrada del mismo en la célula. Cabe resaltar que aparecen regiones hipervariables (HVR) en E2 que son dianas para Ac frente al VHC^{6, 9}.

- No estructurales:

- p7: actúa como canal de cationes al formar hexámeros (viroporina) y participa en la maduración del virus y su liberación^{6, 9}.
- NS2: es una autoproteasa que durante el proceso de fraccionamiento de la poliproteína, junto a NS3 (NS2/3), escinde el enlace entre ambas, NS2 y NS3^{6, 9}.

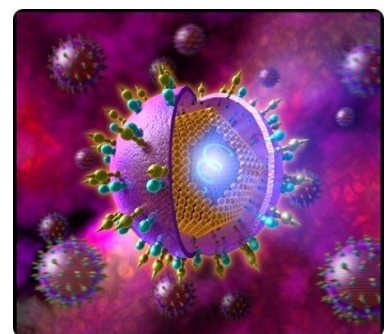


Figura 2. Ilustración del VHC¹⁰.

- NS3 y NS4A: NS3 en el dominio N-terminal tiene actividad serin-proteasa, y ligado a su cofactor NS4A, forma un complejo (NS3/4A) que cataliza la ruptura de 4 enlaces con la consiguiente liberación de NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Además, NS3 en los dos tercios restantes posee actividad helicasa/NTPasa, que permite el desdoblamiento de las cadenas ARN-ARN durante la replicación^{6, 9, 11}.
- NS4B: su función no está del todo determinada, no obstante, se ha visto que promueve la configuración de una red membranosa con un papel destacado en el proceso de replicación y en el de ensamblaje^{6, 9}.
- NS5A: la caracterización de su función también es limitada, aunque los estudios revelan que es trascendental en la replicación viral, al interactuar con múltiples proteínas tanto del huésped como del virus. Además, comprende una región (ISDR) que determina la sensibilidad a IFN- α ^{6, 9}.
- NS5B: enzima imprescindible que permite la replicación del material genético viral gracias a su actividad de ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Sin embargo, no dispone de actividad correctora de pruebas, lo que lleva a una alta tasa de mutación, y por tanto a una alta variabilidad genética^{6, 9}.

B) Variabilidad genética.

Una de las características más destacables del VHC es su gran diversidad genética. A partir de estudios filogenéticos y de secuenciación genómica se han establecido siete genotipos (1-7) que se diferencian en un 30-35% de los nucleótidos. Dentro de estos existen distintos subtipos, con una variación en su secuencia de alrededor de un 15%¹². Las regiones con mayor variabilidad son las que codifican para E1 y especialmente E2 (incluye HVR1 y HVR2), mientras que la región del core o 5'UTR se encuentran altamente conservadas⁵.

Por otro lado, la prevalencia y distribución geográfica de los genotipos no es uniforme: el alcance de los genotipos 1 y 3 es global, y representan en torno al 46% y 30% de las infecciones por VHC respectivamente. Los genotipos 2, 4 y 6 suponen cerca del 23%, y el 1% que queda corresponde al 5. En cuanto al genotipo 7, hay muy pocos casos notificados, originarios de África central⁶.

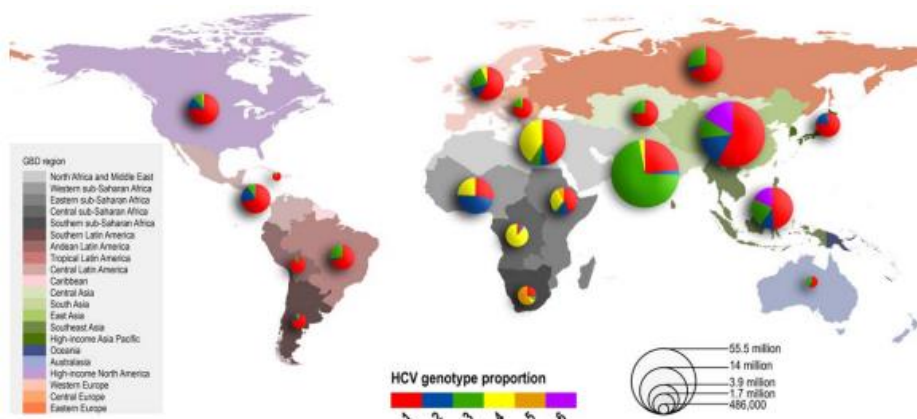


Figura 3. Prevalencia relativa de los genotipos en las distintas regiones¹².

Finalmente, cabe resaltar que esta gran variabilidad genética tiene una serie de consecuencias a la hora de controlar la enfermedad, ya que entraña una gran dificultad para el desarrollo de vacunas y de fármacos pangentotípicos¹². Además, dentro de cada individuo, el VHC que alberga puede sufrir pequeñas mutaciones que dan lugar a quasi-especies, y

estas pueden desembocar, si superan la barrera genética, en resistencias al tratamiento. Las variantes asociadas a resistencia (RAV) pueden aparecer durante la terapia o preexistir¹³.

C) Ciclo de replicación.

El VHC presenta tropismo hepatocelular, de manera que su replicación ocurrirá generalmente en estas células, y en concreto, en el citoplasma. Un aspecto significativo es que las partículas virales están fuertemente vinculadas con distintas lipoproteínas (LDL y VLDL), formando lipovirpartículas. Esta asociación contribuye a una entrada eficaz al interior de las células^{8,9}.

La entrada viral comienza con la unión de baja afinidad del VHC a la célula, mediada por el receptor de LDL y los GAG (glicosaminoglicanos). Esto permite la interacción de E1 y E2 con SRB1 (scavenger receptor class B type 1) y CD81 (tetraspanina). La asociación de E2 con CD81 activa cascadas de señalización a través EGFR (epidermal growth factor receptor) y el receptor de Efrina tipo A2. Estas señales promueven el desplazamiento del complejo VHC-CD81 hacia las proteínas de unión estrecha CLDN1 (claudina 1) y OCLN (occludina), y modulan la unión entre CD81 y CLDN1. También se ha visto de forma reciente que el receptor NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1), implicado en la absorción del colesterol, es esencial en el proceso de entrada^{9, 14, 15}.

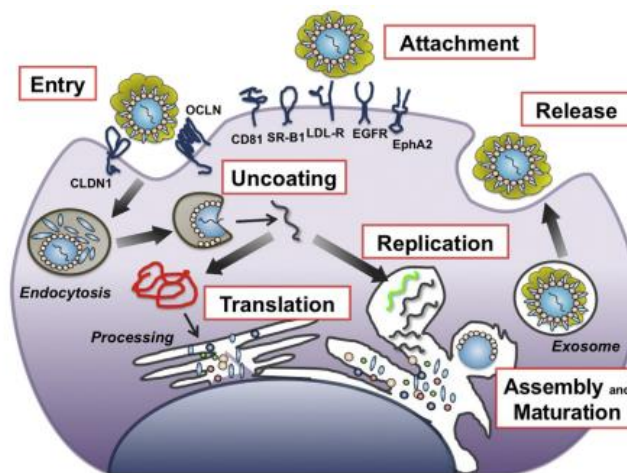


Figura 4. El ciclo de replicación del virus de la hepatitis C (VHC)¹⁶.

El enlace del virus con estos receptores induce la endocitosis mediada por clatrina. Una vez formado el endosoma, el pH ácido interno lleva a la fusión de su membrana con la del VHC, liberando el genoma al citosol^{9, 15}.

La traducción ocurre en el retículo endoplasmático rugoso (RER): el ARN (+) viral actúa como ARNm, y en su región 5'UTR interacciona con los ribosomas a través del IRES para generar la poliproteína. Esta será escindida inicialmente en su región N-terminal por proteasas celulares del RER, permitiendo la maduración de las proteínas estructurales y p7^{8, 9, 14}.

Las proteasas virales NS2/3⁹ y NS3/4A terminarán el procesamiento, y las proteínas no estructurales liberadas quedarán ligadas a las membranas intracelulares. Así, NS4B (junto con NS5A) permite la formación, a partir del RE, de la denominada red membranosa, que es donde se llevará a cabo la replicación por acción de la ARN-polimerasa NS5B. Tomando como base la cadena de ARN (+) se genera un ARN (-) intermedio, que será usado como

molde para la síntesis de múltiples cadenas positivas empleadas en: (a) la traducción genómica, (b) formación de nuevos intermedios, (c) encapsulación en partículas virales^{13, 14}.

El ensamblaje tiene lugar en estructuras citoplasmáticas semejantes a balsas lipídicas. Primero la proteína del core interacciona con el ARN (+) y se conforma la nucleocápside. Cerca se acumulan otras proteínas como p7, E1 y E2. La envoltura es construida a partir de la membrana del RE, en la que se incrustan heterodímeros de E1 y E2. Después, se forman las lipovirionpartículas (que son pleomórficas) al relacionarse con las LDL y VLDL, y estas salen de la célula por la vía secretora constitutiva (exosomas)^{8, 9, 14, 16}.

Además, hay que tener en cuenta que el ciclo de replicación estará regulado por proteínas virales como NS5A (en función de su estado de fosforilación) y la fracción helicasa/NTPasa de NS3, y factores del huésped como la ciclofilina A (se une a NS5A y NS5B) y microARN122 (se une al IRES)¹⁴.

El conocimiento exhaustivo del ciclo de replicación viral, así como de las proteínas que intervienen en este (en gran medida gracias a los avances en cristalografía), ha permitido la detección de posibles dianas (tanto virales como del huésped) para el desarrollo de antivirales^{4, 8}.

3. OBJETIVOS.

1. Conocer las principales dianas frente a las que se desarrollan los distintos antivirales de acción directa, incluyendo la función y estructura de las mismas.
2. Entender el mecanismo de acción por el cual los AADs ejercen su efecto.
3. Exponer cómo la aparición de estos fármacos ha revolucionado el tratamiento de la enfermedad y los desafíos que aún se plantean para erradicar la hepatitis C.

4. METODOLOGÍA.

Este trabajo consiste en una revisión bibliográfica llevada a cabo principalmente a partir de una serie de artículos científicos, cuya búsqueda se ha realizado a través de distintas bases de datos como PubMed, Science direct o Google Académico, y a partir de la información aportada por organismos oficiales como la OMS.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Antivirales de acción directa disponibles actualmente.

A) Inhibidores de NS3/4A.

Diana.

La proteína NS3 desempeña diversas funciones en el ciclo replicativo del VHC, lo que la convierte en una diana antiviral importante¹⁷. Respecto a su estructura, en el extremo N-terminal comprende una pequeña fracción anfipática en forma de hélice α (Helix α_0) y un dominio serin-proteasa. Este último presenta una triada catalítica His-57 Asp-81 Ser-139, que está altamente conservada y es similar a la tripsina; y distante al sitio activo, un lugar de unión para su cofactor NS4A¹³. Asimismo, el dominio proteasa está conectado por un enlazador flexible a un dominio helicasa/NTPasa C-terminal^{17, 18}.

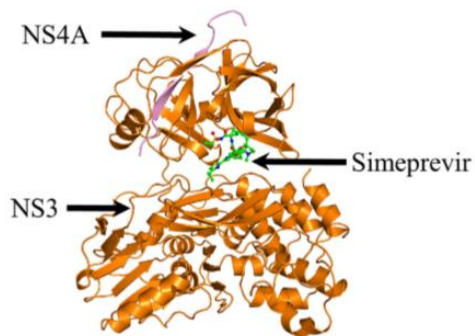


Figura 5. Estructura terciaria de la proteasa NS3/4A del VHC⁶.

La hélice α_0 destaca en la asociación de membranas, la localización subcelular de NS3/4A y su estabilidad, y la morfogénesis del virión. Por otro parte, la actividad proteasa (junto con su cofactor NS4A) es imprescindible para la liberación de las proteínas no estructurales, y también modula la respuesta inmune innata frente al virus: consigue evadir al sistema inmunitario (SI) al escindir las proteínas adaptadoras MAVS y TRIF, ya que intervienen en la señalización mediada por RIG-I y TLR3, que tiene como resultado la transcripción de genes antivirales (ej. IFN tipo I)^{13, 18}.

Finalmente, el dominio helicasa/NTPasa es requerido en la replicación para el desenrollamiento de las dobles cadenas de ARN, y de forma independiente participa, además, en el ensamblaje viral¹⁷. Hay que tener en cuenta que el dominio proteasa influye en la actividad helicasa al ejercer de pinza sobre el ARNbc mientras se van desarrollando las plantillas, permitiendo así el acceso de NS5B y la síntesis de nuevos genomas¹⁸. Al no actuar los diferentes dominios de NS3 de forma aislada, los inhibidores pueden alterar varios puntos del ciclo atacando una sola diana¹³.

Desarrollo.

La experiencia con el VIH en el desarrollo de inhibidores de la proteasa (IP) permitió la salida temprana de los primeros AADs, Boceprevir y Telaprevir. Posteriormente se han ido diseñando nuevos IP, mientras que los fármacos dirigidos a otras actividades de NS3, como la helicasa, podrían desarrollarse en el futuro¹³.

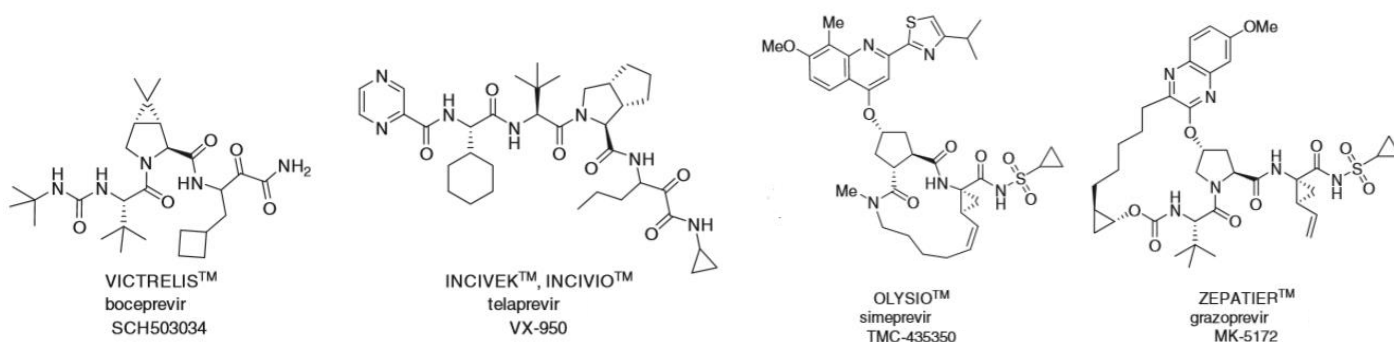


Figura 6. Ejemplos de IP de 1ª generación (Boceprevir y Telaprevir), 2ª generación (Simeprevir) y 3ª generación (Grazoprevir)¹⁹.

Boceprevir y Telaprevir son cetoamidas lineales peptidomiméticas que fueron diseñadas a partir de productos de escisión de NS3/4A que inhibían a la proteína competitivamente. La inhibición va dirigida al sitio activo de la proteasa, formando un enlace covalente reversible con el resto de serina. Se utilizaban junto con PEG-IFN y RBV, pero debido a que solo actuaban frente al genotipo 1, las bajas barreras genéticas y los graves efectos adversos (como la cardiotoxicidad), fueron suspendidos y se desarrollaron nuevos

antivirales, en su mayoría péptidos macrocíclicos, orientados a conseguir terapias pangenotípicas y que solventaban los problemas farmacocinéticos, de potencia, de seguridad y de resistencia. En la segunda generación destaca el Simeprevir, y entre los de tercera generación encontramos Paritaprevir, Grazoprevir, Glecaprevir y Voxilaprevir^{13, 19}.

Mecanismo de acción.

1º. Bloqueo del procesamiento de la poliproteína del VHC. Es la primera y más evidente de sus funciones, si cesa la actividad proteasa, no es posible la maduración de las proteínas no estructurales necesarias para la generación de complejos de replicación y se consigue la erradicación del virus¹⁸.

2º. Inhibición directa de la síntesis de ARN. Se ha observado que los IP son capaces de impedir la síntesis de nuevo ARN viral de forma casi completa en periodos de tiempo inferiores a 12h, antes de que se produzca una disminución significativa de los niveles de NS5B, lo que indica que no se debe a la inhibición del procesamiento de la poliproteína. Esto ocurre porque, como mencionamos anteriormente, los dominios proteasa y helicasa no son independientes, de manera que el bloqueo del primero tiene repercusión en la actividad helicasa, evitando interacciones de NS3 con el molde ARN o con otras proteínas del complejo de replicación^{17, 18}.

3º. Inhibición del ensamblaje/secreción del virus. Se ha descrito que los IP bloquean una etapa tardía en el ensamblaje y/o secreción del virus dando lugar a una rápida (< 12h) y casi completa inhibición de la producción del mismo¹⁷. Al igual que la inhibición de la síntesis de ARN, este efecto precede a la disminución relevante de los niveles de proteínas no estructurales maduras, y además, es mayor que con los inhibidores de la polimerasa, pero más débil que con los inhibidores de NS5A¹⁸.

4º. Restauración de la señalización antiviral. Los estudios sugieren que la reactivación de la respuesta inmune innata podría darse por el efecto de “doble revés”: por un lado inhiben la replicación disminuyendo la producción del virus, mientras que por otro, previenen directamente la escisión de MAVS, lo cual explicaría por qué se recupera antes esta función de defensa antiviral con los IP que con otros tipos de AADs^{17, 18}.

B) Inhibidores de NS5A.

Diana.

La proteína NS5A es una diana inusual, pues tanto su estructura como su actividad están caracterizadas de forma parcial. Sin embargo, se sabe que es esencial en la replicación y el ensamblaje viral, y modulando las vías de señalización en la célula huésped¹⁸. Está constituida por alrededor de 447 aminoácidos y se sitúa en membranas que proceden del RE. El resto citoplasmático incluye tres dominios estructurales (I, II, III) con cuatro regiones funcionales complementarias (A, B, C, D). Además, NS5A puede aparecer en forma fosforilada (p56) e hiperfosforilada (p58), llevando a cabo diferentes funciones^{20, 21}.

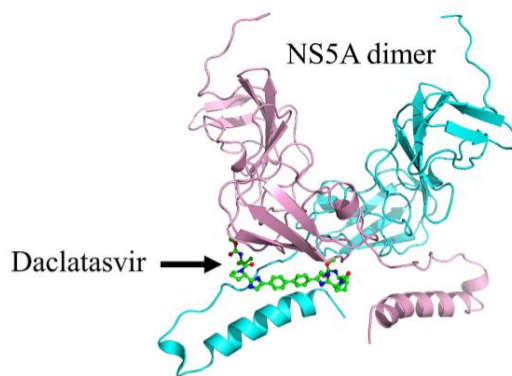


Figura 7. Estructura terciaria de la proteína NS5A del VHC⁶.

Todos los dominios de NS5A interactúan con el ARN del virus. El dominio I es el más conservado y mejor caracterizado. Se corresponde con el extremo N-terminal, y alberga una hélice α anfipática con la que se asocia a las membranas intracelulares y un lugar para su unión al Zn. Este dominio es requerido para la replicación genómica (regiones A, B y C), puesto que, entre otras funciones, es determinante en el establecimiento de la red membranosa, la cual permite la concentración de las proteínas virales que dan lugar al complejo de replicación y protege al ARN viral de ser detectado por el SI. En el extremo C-terminal se encuentran los dominios II y III, que están intrínsecamente desestructurados. El dominio II interactúa con distintas proteínas celulares importantes para el ciclo replicativo, entre ellas la ciclofilina A; por su parte, el dominio III es necesario para el ensamblaje y para la secreción de viriones (región D), lo cual podría explicarse, en cierto modo, debido a que es donde se encuentra la apolipoproteína E (ApoE) de NS5A, y se ha visto que la inhibición de su expresión se traduce en una fuerte disminución de la producción de viriones sin verse afectados los procesos de entrada y replicación^{13, 18, 20, 21}.

Desarrollo.

Debido a las limitaciones en la caracterización de NS5A, el desarrollo de estos AADs no se basó en ensayos bioquímicos y la relación estructura-actividad como en el caso de los inhibidores de NS3/4A y NS5B, sino que se llevó a cabo una selección de moléculas a partir de bibliotecas de compuestos, descartando, por ejemplo, aquellos activos frente a otros virus (por falta de especificidad) o que inhibían a NS3/4A o NS5B. Surgió así el Daclatasvir^{13, 18}.

Distintas líneas de evidencia llevaron a determinar que la diana de compuestos como el Daclatasvir (ej. Ledipasvir, Ombitasvir) era NS5A, pero la más relevante fue que la aparición de resistencias estaba asociada a mutaciones en el dominio I de esta proteína, que resulta ser el sitio de unión. La elevada potencia de estas moléculas (pM-nM) es debida en gran parte a la simetría de su estructura, lo que también sugirió que estos inhibidores interactuaban con la forma dimerica de NS5A¹⁸.

La optimización de estos compuestos ha derivado en la aparición de los inhibidores de NS5A de segunda generación, para obtener tratamientos pangenotípicos, activos frente a las RAV conocidas previamente y con toxicidad disminuida, como Elbasvir y Velpatasvir¹³. A pesar de esto no se usan en monoterapia, sino que, al no presentar resistencias cruzadas con otros AADs, se usan en regímenes libres de IFN en combinación con inhibidores de NS5B análogos de nucleósidos o terapia triple con IP reforzado con ritonavir + inhibidor de NS5B no nucleosídico, aumentando así la barrera de resistencia^{18, 20}.

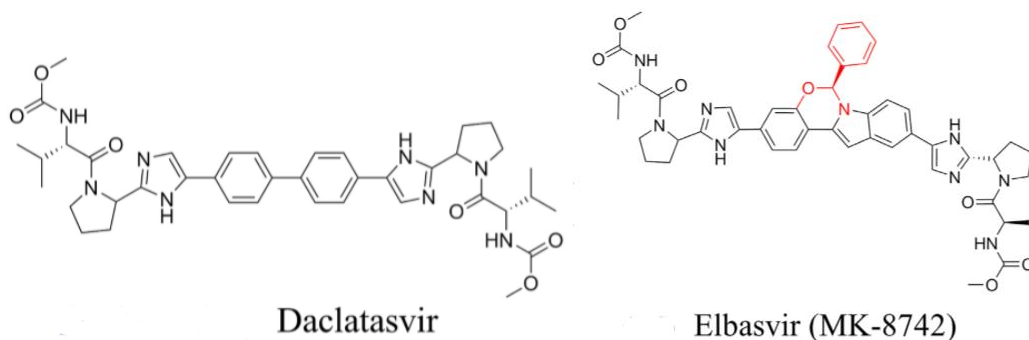


Figura 8. Ejemplos de inhibidores de NS5A de 1ª generación (Daclatasvir) y 2ª generación (Elbasvir)⁶.

Mecanismo de acción.

No se conoce el mecanismo exacto por el cual estos inhibidores llevan a cabo su acción. Si bien, los estudios indican que, sin afectar a la dimerización y estabilidad de NS5A, dificultan su actividad en distintos puntos del ciclo de replicación, lo que explicaría su potencia^{6, 20}.

1º. Efectos sobre la replicación del ARN. Se postula que estos inhibidores podrían bloquear funciones de NS5A requeridas directamente a la hora de formar el complejo de replicación viral²¹, como por ejemplo, el establecimiento de la red membranosa. Al dañar la interacción de NS5A con la fosfatidilinositol 4-quinasa III α (PI4KIII α), no se produciría un aumento de PI4P y del tráfico de colesterol posterior, que son imprescindibles para la generación y mantenimiento de la red membranosa¹⁸. La magnitud de esta inhibición es enorme, por cada molécula de Daclatasvir se inhiben 47.000 de NS5A²¹.

2º. Efectos sobre el ensamblaje. La alteración en la localización subcelular de la proteína, a raíz de su redistribución desde el RE hasta la superficie de las balsas lipídicas²⁰, provoca que el ensamblaje viral sea defectuoso. Más concretamente, se impide la transferencia genómica a los sitios de ensamblaje, y de esta forma el ARN no interactuaría con la proteína del core y no se formaría la nucleocápside^{13, 20}. La acción sobre el ensamblaje produce una rápida disminución de la carga viral (6-9h tras el inicio del tratamiento), que precede al subsiguiente descenso (40h) debido probablemente al bloqueo en la síntesis de ARN¹⁸.

3º. Otros efectos. Impiden la señalización mediada por la interacción de NS5A con distintos componentes tanto virales como celulares, y, en consecuencia, aumenta la acción anti-VHC²¹. También se ve inhibida la hiperfosforilación (la fosforilación de ciertos residuos de la proteína regula su actuación durante el ensamblaje y la replicación)^{18, 20}.

C) Inhibidores de NS5B.

Diana.

Como se mencionó anteriormente, NS5B es una ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp)²², y representa un objetivo crucial en el desarrollo de AADs, ya que es la enzima encargada de replicar el genoma del VHC¹⁸.

La estructura de la proteína es similar a una mano derecha, consta de 591 aa y alberga 3 dominios: pulgar, palma y dedos. Los 21 aa hidrófobos del extremo C-terminal permiten el anclaje a la membrana del RE en la replicación. El dominio de la palma está altamente conservado y en él se encuentra el sitio activo. Los dedos y el pulgar se enlazan por bucles que estabilizan las conformaciones abiertas y cerradas precisadas para la unión del ARN y el desplazamiento del enzima durante el proceso de elongación. También es importante conocer que el dominio del pulgar tiene un bucle de horquilla β que regula la actividad polimerasa y que NS5B forma oligómeros para sintetizar cadenas de ARN positivas y negativas²³.

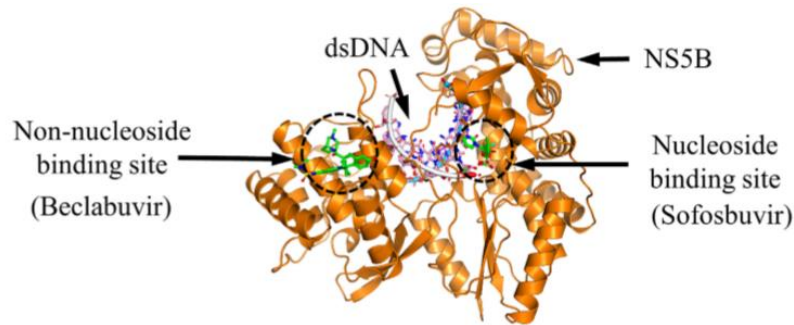


Figura 9. Estructura terciaria de la polimerasa NS5B del VHC⁶.

Desarrollo.

Tras conocer la estructura cristalina de la proteína a finales de los 90, se vio que existía homología estructural con otras polimerasas (virales y celulares). Utilizando distintos ensayos bioquímicos, enzimáticos y sistemas de replicones se han encontrado distintas moléculas que se unen a varios sitios de NS5B^{18, 23}. Es por ello que estos AADs se clasifican en dos grandes grupos: inhibidores análogos de nucleós(t)idos (NIs) y no nucleos(t)ídicos (NNIs)²².

- Inhibidores análogos de nucleós(t)idos (NIs).

Su diseño se basó en los conocimientos que ya existían sobre otras polimerasas¹³. Los NIs van dirigidos al sitio activo del enzima, ya que son similares al sustrato natural de la misma (mantienen el hidroxilo en 3', mientras que en 2' aparecen grupos que generan impedimento estérico, como $-CH_3$)^{22, 23}.

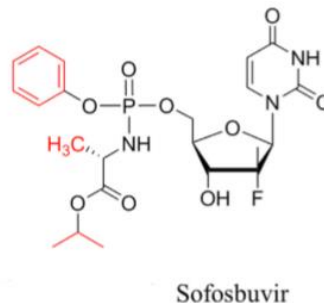


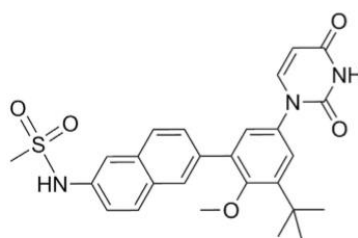
Figura 10. Ejemplo de NI (Sofosbuvir)⁶.

Al estar muy conservado el sitio catalítico de NS5B, la eficacia de estos AADs es parecida en los distintos genotipos del VHC, es decir, presentan actividad pangnotípica. Otras ventajas son su elevada potencia, que muestran una barrera genética alta frente a la

resistencia, y que, debido a la corta duración de los tratamientos actuales, se previenen los efectos adversos derivados de la acumulación de este tipo de fármacos. Destaca el Sofosbuvir, que fue el primer inhibidor de NS5B aprobado por la FDA en 2013, y que a día de hoy se sigue utilizando con otros tipos de AADs en la mayoría de terapias combinadas contra la hepatitis C^{13, 18}.

- Inhibidores no nucleos(t)ídicos (NNIs).

Las moléculas que actúan como NNIs se identificaron a partir de bibliotecas de compuestos que inhibían la actividad polimerasa *in vitro*¹⁸. Lo primero que hay que conocer de estos AADs es que no se dirigen al sitio activo, sino que son inhibidores alostéricos. Existen diferentes sitios de unión: palma-1, palma-2, pulgar-1, pulgar-2 y uno en la horquilla β . Se ha desarrollado un grupo farmacológico para cada uno de ellos, no obstante, el único NNI aprobado hasta la fecha es el Dasabuvir^{13, 22}.



Dasabuvir

Figura 11. Ejemplo de NNI (Dasabuvir)⁶.

El espectro de actividad frente a los distintos genotipos del VHC es más restringido que en el caso de los NIs, y la barrera genética es más baja, puesto que al actuar en sitios alostéricos lejanos al sitio activo conservado, la aparición de RAV es más probable^{18, 23}.

En cuanto al Dasabuvir, se dirige al sitio alostérico palma-1, y sólo está recomendado para el tratamiento del VHC-1 en combinación con un IP (paritaprevir potenciado con ritonavir) y un inhibidor de NS5A (ombitasvir), y se añade RBV en caso de haber cirrosis. Mejora la eficacia del tratamiento y reduce su duración^{13, 18, 23}.

Mecanismo de acción.

- Inhibidores análogos de nucleos(t)idos (NIs).

Al tener una estructura semejante al sustrato natural de NS5B, se incorporan a la cadena de ARN viral en crecimiento e impiden la polimerización actuando como terminadores de cadena^{18, 22}. Se administran en forma de profármacos que se bioactivan en el hígado y posteriormente son fosforilados por quinasas celulares para llevar a cabo su acción²³.

- Inhibidores no nucleos(t)ídicos (NNIs).

Son inhibidores no competitivos que al unirse al sitio alostérico correspondiente, inducen un cambio conformacional en la polimerasa que limita su actividad (bloquean las etapas de inicio y elongación en la síntesis del ARN viral)^{18, 23}.

5.2. Otros fármacos en desarrollo y potenciales dianas.

Una de las ideas más importantes que pretende transmitir este trabajo, es que todas las proteínas virales y/o factores del hospedador que son esenciales en el proceso de replicación del VHC constituyen potenciales dianas frente a las que dirigir nuevos antivirales¹³.

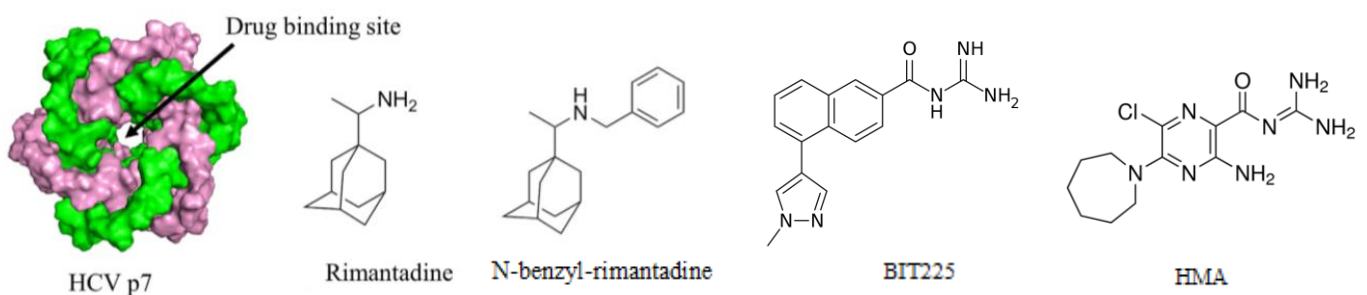
A) Dianas virales alternativas.

Para evitar la aparición de RAV, la estrategia más utilizada es la combinación de AADs de distintas clases, y esto ha derivado en el estudio de posibles alternativas a los objetivos antivirales clásicos (proteasa, NS5A y polimerasa)¹³. Algunos ejemplos:

- Proteína no estructural p7.

Se trata de una proteína integral de membrana de 63 aa, en cuya estructura aparecen dos hélices α transmembrana conectadas por una cadena flexible. Esta forma hexámeros que se ensamblan y generan un canal catiónico, por lo que se clasifica dentro de las vioporinas⁸. Pese a que la función de p7 no está determinada de forma exacta, se ha demostrado que es una proteína multifuncional con un papel fundamental en el ensamblaje y la liberación del virus: interviene en la regulación de la vía secretora celular (secreción de partículas infecciosas), y también regula las interacciones entre otras proteínas del VHC, así como la localización de NS2 y la proteína del core¹³.

Una vez conocida la estructura cristalina de p7 se hizo una selección de alto de rendimiento de compuestos que interferían con su actividad y se identificaron moléculas con potencial antiviral, como la rimantadina y su N-bencil derivado⁶. Esta familia de compuestos, de forma previa a la aparición de una RAV, se usaba ampliamente frente a la vioporina M2 del virus Influenza A^{13, 24}. Si las mismas moléculas inhiben vioporinas de diferentes virus, a pesar de que estas sean muy distintas, implica que existe la posibilidad de descubrir antivirales de amplio espectro¹³.



Otros fármacos han sido diseñados para inhibir p7, como la hexametilnamilorida (HMA), aunque despertó más interés BIT225, ya que actúa frente a la proteína p7 del VHC, pero también frente a la proteína Vpu del VIH, por lo que podría ser de gran utilidad para tratar pacientes coinfectados. Estos inhibidores aún no están disponibles, y tienen la limitación de que no son pangénóticos, su eficiencia depende del genotipo del VHC. Aun así, p7 representa una diana alternativa prometedora¹³.

- Proteínas estructurales E1 y E2.

Son glicoproteínas imprescindibles para la unión y la fusión a la célula, por lo que se plantean como un objetivo interesante frente al que generar nuevos antivirales o incluso vacunas. E1 y E2 forman heterodímeros, y su estructura se está dilucidando paulatinamente. Lo más remarcable son las estructuras cristalinas globulares constituidas por láminas β en sus ectodominios, las dos hélices α en las regiones del tallo, y los dominios transmembrana C-terminales que son α -helicoidales, pero sigue habiendo muchos detalles de la estructura de E1/E2 que aún no se conocen. Los heterodímeros E1/E2 se encuentran embebidos en la envoltura del virión, por lo que son esenciales en los procesos de entrada y secreción viral, que se ven facilitados por la unión a lipoproteínas del suero, generando lipovirpartículas (más dirigido a la obtención de vacunas, la asociación con las lipoproteínas, el alto grado de glicosilación, y la existencia de regiones hipervariables en E2 contribuyen a enmascarar la presencia del VHC parcialmente). Al comprender el mecanismo de entrada del virus y conocer la estructura y el papel que desempeñan E1 y E2, se abre la posibilidad de diseñar compuestos que bloqueen este proceso²⁵.

Hasta el momento no se han aprobado inhibidores de E1/E2, pero sí que se han descubierto ciertos compuestos capaces de bloquear la unión y entrada del VHC al neutralizar las glicoproteínas E1 y E2. Se encuentran en fase de ensayos preclínicos, pero podrían ofrecerse como una estrategia terapéutica interesante⁶.

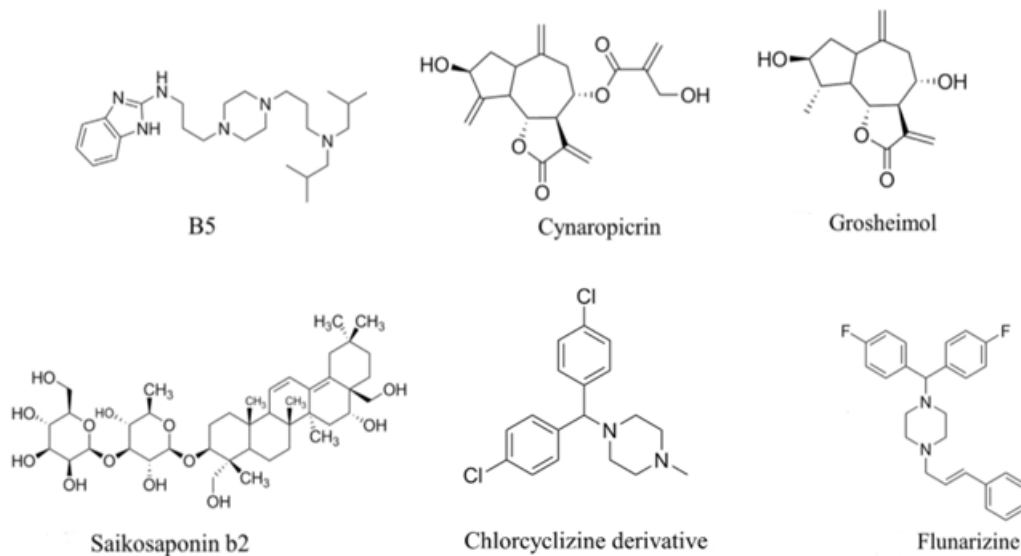


Figura 13. Fórmulas químicas de inhibidores experimentales de E1/E2⁶.

(1) *Derivado de bencimidazol B5*: actúa a nivel de los hepatocitos impidiendo la entrada del VHC. Previene la infección de forma dosis-dependiente y pangenotípica. En cuanto a la resistencia, se ha encontrado una mutación a nivel de E1^{6, 26}. (2) *Cinaropicrina y grosheimol*: son productos naturales (lactonas sesquiterpénicas) que provienen de la alcachofa egipcia silvestre. Interfieren con la entrada viral bloqueando la capacidad de infección de los 7 genotipos del VHC, aunque el mecanismo de acción no está claro⁶. (3) *Saikosaponina b2*: es un terpenoide natural que se obtiene de la raíz de *Bupleurum kaoui*. Limita la infección por el VHC en sus estadios más tempranos al actuar sobre la glicoproteína E1^{6, 27}. (4) *Derivado de clorciclizina*: es un compuesto derivado del antihistamínico clorciclizina hidrocloreuro que fue optimizado a partir del análisis estructura-actividad. Este

cesa el proceso de entrada viral en los hepatocitos. (5) *Flunarizina*: es un bloqueante de los canales de Ca utilizado para combatir la migraña, pero se identificó a partir de una biblioteca de compuestos como inhibidor del VHC. Impide el proceso de fusión del VHC (genotipo 2) con la membrana celular al dirigirse a E1. (6) *Anticuerpos monoclonales*: se estudiaron los Ac monoclonales humanos con gran capacidad de neutralización y sinergia en las infecciones causadas por los genotipos 1, 2 y 3 del VHC. Se dirigen a epítomos situados en E1 y E2⁶.

- Proteína no estructural NS4B.

Se caracteriza por su gran hidrofobicidad. Está conformada por dos hélices α (AH1 y 2) anfipáticas en la región N-terminal, cuatro segmentos transmembrana, y otras dos hélices α que se encuentran en contacto con la membrana del RE en la región C-terminal. La topología de esta proteína en la membrana es variable, por lo que AH2 acaba constituyendo el quinto dominio transmembrana, probablemente tras la oligomerización de NS4B. Respecto a su función, es la principal responsable de inducir la formación de la red membranosa, aunque precisa de la actividad conjunta de otras proteínas. También parece estar involucrada de una forma más directa en la replicación, puesto que se cree que se une al ARN (-) viral en 3'; y podría estar implicada en el ensamblaje⁸.

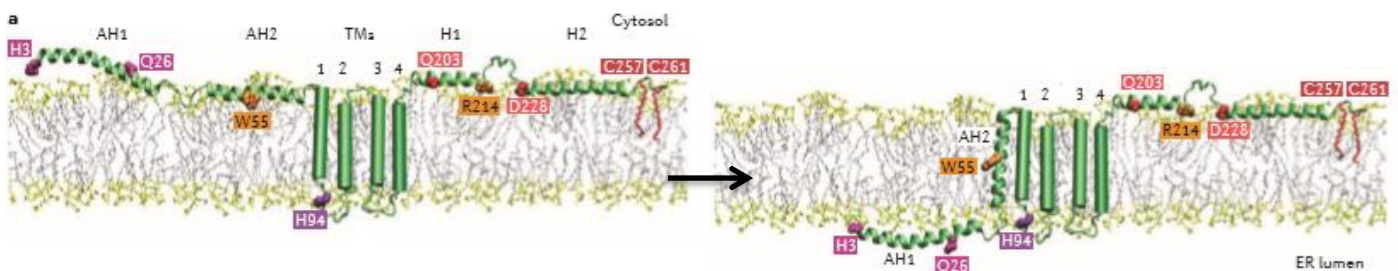


Figura 14. Proteína NS4B asociada a la membrana del RE⁸.

No existen inhibidores aprobados frente a NS4B, la mayoría se encuentran en fases iniciales de desarrollo. (1) *PTC725*: es un inhibidor dirigido a NS4B que surgió de la optimización de una 6-(indol-2-il)piridina-3-sulfonamida y que demostró una potente acción antiviral frente al VHC-1. Los perfiles farmacocinéticos en animales (ratas, perros y monos) son favorables, pero se requieren más estudios para su uso clínico. (2) *Derivado de 2-oxadiazoloquinolina*: reveló *in vitro* una actividad prometedora frente a NS4B, aunque el uso clínico del mismo precisa una investigación más amplia⁶. (3) *Derivado de imidazo[2,1-b]tiazol*: se trata de un inhibidor experimental cuya diana es NS4B y ha mostrado una actividad sinérgica con inhibidores como simeprevir, daclatasvir o sofosbuvir, lo cual permitiría una disminución en la dosis de los mismos para tratar infecciones por VHC-1b. Al igual que los anteriores, son necesarios más estudios^{6,28}. Se han diseñado más inhibidores de NS4B cuyo desarrollo se ha suspendido, como por ejemplo los derivados de la piperazona⁶.

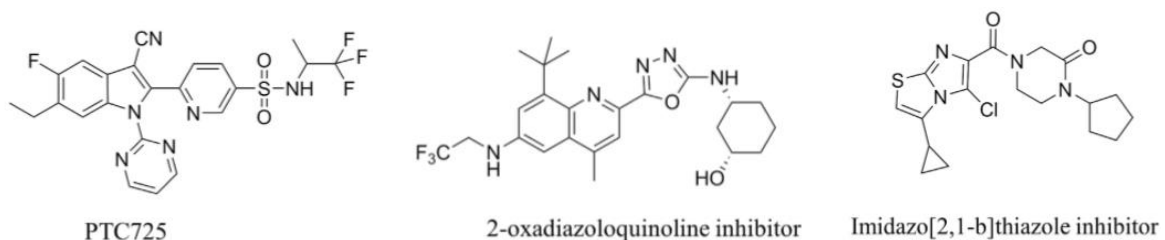


Figura 15. Fórmulas químicas de inhibidores experimentales de NS4B⁶.

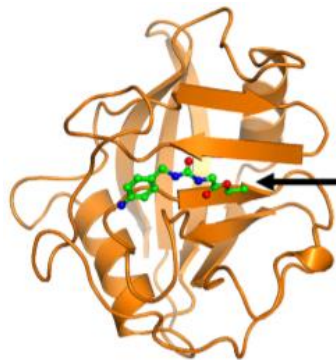
B) Inmunomoduladores/inhibidores de proteínas celulares del hospedador.

El genoma del VHC es propenso a sufrir mutaciones, por lo que podrían aparecer resistencias a todos los AADs mencionados anteriormente. Pese a que el objetivo principal siempre ha sido el virus, es interesante el estudio de antivirales que tengan como diana factores del huésped. Así la barrera genética a la resistencia sería mayor y poseerían actividad pangenotípica. Los antivirales dirigidos al huésped se conocen por sus siglas en inglés HTA (host-targeting antivirals), y de hecho, el primer tratamiento para el VHC fue la proteína inmunomoduladora INF, que sería un tipo de HTA¹³.

- Inhibidores de la ciclofilina A (CypA).

Las ciclofilinas son proteínas celulares que participan en diversas funciones como el plegamiento de otras proteínas, y también el tráfico y la señalización celular¹³. Se descubrió que la CypA era clave en el ciclo del VHC cuando la administración de ciclosporina A, la cual se dirige a este factor, limitó la replicación del virus en cultivos celulares. No se conoce cómo interviene exactamente la CypA en el ciclo de replicación, pero se vio que interactuaba con los dominios II y III de NS5A, por lo que se piensa que podría impedir el plegamiento correcto de esta proteína y afectar consecuentemente al complejo de replicación. Se le atribuye además un papel en el proceso de reclutamiento de NS5B⁸.

Los antagonistas de CypA pueden ser derivados de ciclosporinas o no, pero en cualquier caso carecen de la actividad inmunosupresora¹³. Estas moléculas actúan básicamente cesando la unión de CypA y NS5A de forma dosis-dependiente y restaurando la respuesta inmunitaria del organismo^{6, 13}.



Cyclophilin A

Figura 16. Estructura terciaria de la ciclofilina A⁶.

(1) *Alisporivir*: es un derivado de ciclosporinas (Cs) no inmunodepresor que inhibe la actividad de CypA al restringir su interacción con NS5A. Por esto podría usarse buscando una relación sinérgica junto con los inhibidores de NS5A. Además, favorece la activación de las células T. Sin embargo, se suspendió en la fase 3 de los EECC por la aparición de graves eventos adversos. (2) *NIM258*: también es un análogo no inmunosupresor de Cs que inhibe a la CypA con una eficacia comparable al anterior^{6, 8}. (3) *Derivado de bis-amida*: se diseñó a partir de la relación estructura-actividad, y se comprobó que impedía la replicación del VHC, con una toxicidad mínima tanto *in vitro* como *in vivo*. A su vez restauró la acción del SI del huésped. (4) *Derivado de fenilpirrolidina*: se descubrió mediante pruebas de resonancia magnética nuclear, cristalografía de rayos X y optimización estructural de compuestos. Este

parece ser un inhibidor de amplio espectro⁶. Algunos de estos HTA también bloquean la replicación del VIH, por lo que podrían ser útiles en pacientes coinfectados¹³.

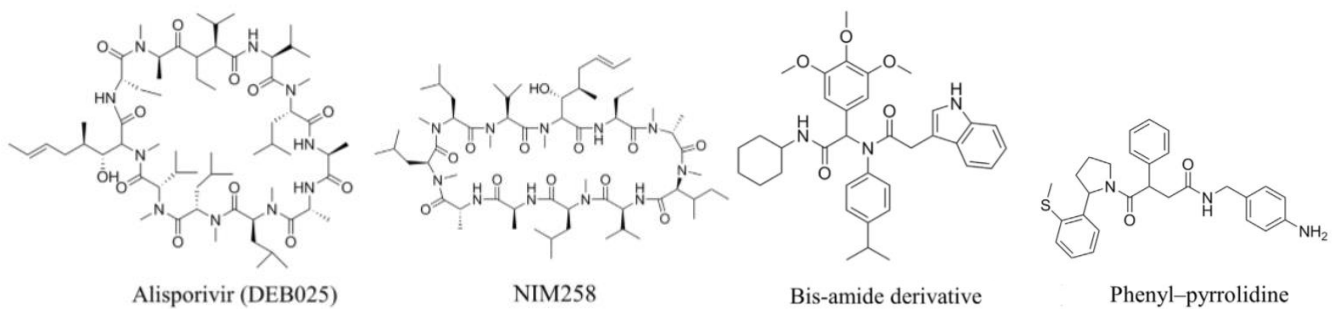


Figura 17. Inhibidores de la ciclofilina A⁶.

- Inhibidores del miR-122.

El miR-122 es un importante factor del hospedador que se expresa mayoritariamente en el hígado. Existen dos sitios de unión al genoma del VHC en 5'UTR, y uno en 3'UTR, aunque la interacción con este último parece no ser imprescindible. Su importancia en la infección se basa en optimizar la replicación de distintas formas, por ejemplo: estabiliza el ARN viral y lo protege de la degradación por parte de la exoribonucleasa-1; y favorece la traducción genómica⁸.



Figura 18. Esquema de 5'UTR del genoma del VHC y los dos sitios de unión para miR-122. Secuestro de miR-122 por miravirsen (nucleótidos modificados con ácido nucleico bloqueado = [LNA]- modified nucleotides)⁸.

En la figura 18 vemos un ejemplo de inhibidor de miR-122 (miravirsen), pero independientemente del mecanismo de acción, la disminución de este factor frena eficazmente, *in vitro* e *in vivo*, la replicación del VHC. No obstante, en ratones se observó que estos inhibidores aumentan el riesgo de desarrollar esteatohepatitis, fibrosis o carcinoma hepático, porque miR-122 es esencial en la homeostasis lipídica de los hepatocitos y tiene actividad supresora de tumores⁸.

- Otros HTA.

(1) *Isotiazolo[5,4-b]piridinas*: su objetivo es GAK, una serin-treonina quinasa asociada a la ciclina G, que es fundamental en los procesos de entrada y ensamblaje viral. Demostraron una gran actividad frente al VHC al bloquear esta proteína. (2) *ITX-5061*: se trata de un inhibidor del receptor SRB1, el cual es clave para la entrada viral. Al no presentar resistencia cruzada *in vitro*, en principio podría combinarse con distintos AADs. Además,

mostró un buen perfil de seguridad y tolerabilidad. (3) MA026: producto de la fermentación de *Pseudomonas* se aisló este lipociclodepsipéptido, que bloquea la entrada del VHC de forma eficiente. Tras indagar en su mecanismo de acción, se descubrió que interactuaba con el receptor Claudina-1⁶.

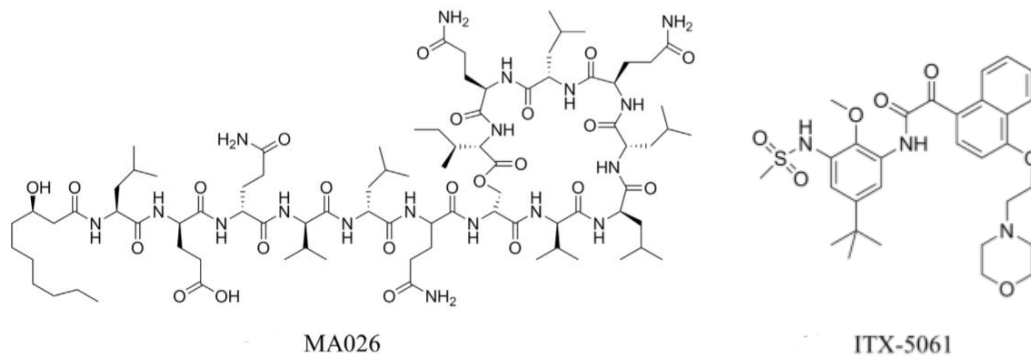


Figura 19. Otros HTA⁶.

6. CONCLUSIONES.

En la revisión se ha mostrado un esquema general de los antivirales usados en la terapia y aquellos que están en desarrollo.

La aparición de estos nuevos fármacos en tan poco tiempo, fruto de grandes esfuerzos en investigación¹³, ha supuesto un cambio drástico en el tratamiento de la hepatitis C:

- Se han logrado instaurar regímenes libres de interferón (menor incidencia de efectos secundarios y más efectivos al actuar directamente sobre las proteínas del VHC);
- las terapias pangenotípicas se están convirtiendo en una realidad (diferentes combinaciones de AADs brindan una eficacia inhibitoria mayor);
- la adherencia es más sencilla debido a que se ha simplificado la posología (1 píldora/día), a que la duración de los tratamientos es menor (48 semanas → 12-8 semanas) y a que la vía de administración es oral, a pesar del estado cirrótico o el historial de tratamiento;
- la RVS llega a ser de hasta un 90-95%⁶.

Así mismo, estos enormes avances han llevado consigo una disminución de la financiación y del interés en la investigación de nuevas moléculas, lo cual es un error, porque nos aleja del objetivo de erradicar la infección por VHC^{13, 29}. Si bien es cierto que, gracias a estos potentes fármacos, en los próximos años asistiremos a una importante disminución de los casos de hepatitis C, aún hay obstáculos que vencer para acabar con la enfermedad⁶.

En primer lugar, hay una minoría de pacientes con escasas opciones terapéuticas, los llamados “pacientes difíciles de tratar” (coinfectados con virus como el VHB, con disfunción renal y/o hepática, que hayan fracasado previamente al tratamiento o que posean un injerto hepático). En segundo lugar, sería conveniente disponer de más alternativas a los AADs ya existentes para prevenir los problemas derivados de las posibles futuras resistencias. En tercer lugar, para la erradicación se precisa que la atención médica y el diagnóstico sean accesibles, especialmente en países en vías de desarrollo donde la incidencia es alta y los recursos son limitados^{6, 13}.

Por último, no se desarrolla inmunidad frente al VHC, e incluso pacientes que han superado la enfermedad tras tratamiento con AADs están en riesgo de sufrir una reinfección, por ello, para la erradicación es esencial el desarrollo de una vacuna²⁹.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Hepatitis C [Internet]. Who.int. 2018 [citado 28 Ene 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
2. Velez-Moller P. Estado actual de la epidemiología, diagnóstico, tratamiento y control de la hepatitis C. Ciencia, Tecnología y Salud. 2017 [citado 28 Ene 2019]. 4(1): 87-129. Disponible en: <http://digi.usac.edu.gt/ojsrevistas/index.php/cytes/article/view/251/255>
3. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cacciapuoti C. Hepatitis C virus (HCV) genotypes distribution: an epidemiological up-date in Europe. Infectious Agents and Cancer. 2016; 11(1).
4. Zopf S. Advances in hepatitis C therapy: What is the current state - what come's next?. World Journal of Hepatology. 2016;8(3):139.
5. Bastos J, Padilla M, Caserta L, Miotto N, Vigani A, Arns C. Hepatitis C virus: Promising discoveries and new treatments. World Journal of Gastroenterology. 2016;22(28):6393.
6. Li G, De Clercq E. Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. Antiviral Research. 2017; 142:83-122.
7. Jin G, Lee J, Lee K. Chemical genetics-based development of small molecules targeting hepatitis C virus. Archives of Pharmacal Research. 2017; 40(9):1021-1036.
8. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. Nature Reviews Microbiology. 2013; 11(7):482-496.
9. Abdel-Hakeem M, Shoukry N. Protective Immunity Against Hepatitis C: Many Shades of Gray. Frontiers in Immunology. 2014; 5.
10. <http://choopersguide.com/content/hepatitis-c-genotype-2-treatment.html>
11. Flechsig H. Computational biology approach to uncover hepatitis C virus helicase operation. World Journal of Gastroenterology. 2014;20(13):3401.
12. Messina J, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke G, Pybus O et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology. 2014;61(1):77-87.
13. Alazard-Dany N, Denolly S, Boson B, Cosset F. Overview of HCV Life Cycle with a Special Focus on Current and Possible Future Antiviral Targets. Viruses. 2019;11(1):30.
14. Manns M, Buti M, Gane E, Pawlotsky J, Razavi H, Terrault N et al. Hepatitis C virus infection. Nature Reviews Disease Primers. 2017; 3:17006.
15. Lindenbach B, Rice C. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. Nature Reviews Microbiology. 2013; 11(10):688-700.
16. Dustin L, Bartolini B, Capobianchi M, Pistello M. Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. Clinical Microbiology and Infection. 2016;22(10):826-832.
17. McGivern D, Masaki T, Lovell W, Hamlett C, Saalau-Bethell S, Graham B. Protease Inhibitors Block Multiple Functions of the NS3/4A Protease-Helicase during the Hepatitis C Virus Life Cycle. Journal of Virology. 2015;89(10):5362-5370.
18. Williford S, McGivern D. Mechanism of Action of Direct-Acting Antivirals: New Insights into the HCV Life Cycle. Hepatitis C Virus II. 2016; 287-301.

19. McCauley J, Rudd M. Hepatitis C virus NS3/4a protease inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*. 2016;30:84-92.
20. Pawlotsky J. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2013 59:375–382.
21. Gao M, O’Boyle D, Roberts S. HCV NS5A replication complex inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*. 2016;30:151-157.
22. Chueca Porcuna N, Álvarez Estévez M, Parra Ruiz J, Hernández Quero J, García García F. Actualización en la terapia de la hepatitis C. Nuevos fármacos, monitorización de la respuesta y resistencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013;31:40-47.
23. Dash S, Aydin Y, Stephens C. Hepatitis C Virus NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase Inhibitor: an integral part of HCV Antiviral Therapy. *Viral Polymerases*. 2019:211-235.
24. Jalily P, Eldstrom J, Miller S, Kwan D, Tai S, Chou D et al. Mechanisms of Action of Novel Influenza A/M2 Viroporin Inhibitors Derived from Hexamethylene Amiloride. *Molecular Pharmacology*. 2016;90(2):80-95.
25. Freedman H, Logan M, Law J, Houghton M. Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infectious Diseases*. 2016;2(11):749-762.
26. Vausselin T, Séron K, Lavie M, Mesalam A, Lemasson M, Belouzard S et al. Identification of a New Benzimidazole Derivative as an Antiviral against Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*. 2016;90(19):8422-8434.
27. Lin L, Chung C, Hsu W, Chang S, Hung T, Shields J et al. Saikosaponin b2 is a naturally occurring terpenoid that efficiently inhibits hepatitis C virus entry. *Journal of Hepatology*. 2015;62(3):541-548.
28. Wang N, Xu Y, Zuo W, Xiao K, Liu L, Zeng X et al. Discovery of Imidazo[2,1-b]thiazole HCV NS4B Inhibitors Exhibiting Synergistic Effect with Other Direct-Acting Antiviral Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;58(6):2764-2778.
29. Bartenschlager R, Baumert T, Bukh J, Houghton M, Lemon S, Lindenbach B et al. Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: Considerations for scientists and funding agencies. *Virus Research*. 2018;248:53-62.