

Nuevos tratamientos para la hepatitis C

Lucía Gil-Guerrero, Pablo Sarobe y Jesús Prieto

*Clínica Universitaria y Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA).
Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra. España.*



La infección por el virus de la hepatitis C constituye un importante problema de salud pública, no sólo por su alta prevalencia en muchos países occidentales y del tercer mundo, sino también por la alta tasa de resistencia al tratamiento antivírico hoy disponible, consistente en

El diseño de nuevas estrategias terapéuticas presupone avanzar en la comprensión de los mecanismos por los que el virus de la hepatitis C (VHC) se evade de los 2 principales

mecanismos de los que se vale el agente infeccioso para evadir la respuesta inmune e interferónica. Estos nuevos enfoques terapéuticos apuntan a objetivos diversos: a) la inhibición de la replicación vírica con bloqueantes de la proteasa y/o de la replicasa del virus, b) la utilización de tipos de interferón con más potencia antivírica, c) la inducción de respuesta inmune específica antivírica mediante el uso de agentes inmunomoduladores o vacunación terapéutica, d) el bloqueo de la infección "de novo" de otras células con anticuerpos neutralizantes, e) la inducción de un estado antivírico en el hígado utilizando estrategias de transferencia génica del gen del interferón o de citocinas inmuno-estimuladoras.

sin comprometer la respuesta del huésped frente a otros patógenos. La investigación en la biología del virus está proporcionando claves para entender los mecanismos por los que el VHC escapa a los sistemas de defensa antivírica del organismo, que son básicamente los mismos por los que resiste a la medicación antivírica. La cronicidad de la infección por el VHC y la falta de respuesta al tratamiento responden en esencia a 2 hechos principales: a) la heterogeneidad y variabilidad del genoma vírico, que es consecuencia de la poca fidelidad del VHC polimerasa y que hace que la composición de las cuasiespecies del virus cambie con facilidad ante la presión de la respuesta inmunitaria humoral y celular, y b) el bloqueo de vías de señalización necesarias para la actividad de moléculas (citocinas y otros factores) con acciones antivíricas y/o inmuoestimuladoras, lo cual es resultado de la interacción de las proteínas víricas con las de la célula huésped.

New therapies for hepatitis C

Hepatitis C virus is an important public health threat, not only because of the high prevalence of this infection in western and third world countries, but also because of the high rate of resistance to the available antiviral therapy that consists on the use of pegylated interferon plus ribavirin. Currently, new forms of therapy are being developed based on a more precise knowledge of the structure and function of the viral proteins and of the strategies used by the virus to escape the immune and interferon systems. The new therapeutic approaches aim at different objectives: a) the inhibition of viral replication by blocking the viral protease and/or replicase; b) the use of other types of interferon with more potent antiviral effect, c) the induction of a specific anti-viral immune response by means of immunomodulatory compounds or therapeutic vaccination, d) the blockade of "de novo" infection of other cells with neutralizing antibodies, e) the induction of a antiviral state in the liver by transferring to this organ the gene of interferon and/or immunostimulating cytokines.

Las dianas del tratamiento: disminuir la producción de partículas víricas, eliminar las células infectadas y proteger frente a la infección de novo de otras células

La viremia en la infección crónica por el VHC depende del equilibrio entre la producción de partículas víricas y su destrucción y degradación en órganos periféricos. La vida media del virión del VHC se estima en 2-3 h y la producción diaria (que en condiciones de viremia estable es igual a la tasa de destrucción periférica) es de 10^{12} partículas víricas³. A su vez, la producción de partículas víricas depende de la tasa de replicación del virus en las células que infecta y del número de células infectadas. Por otra parte, la cantidad de células infectadas refleja el equilibrio entre su tasa de destrucción (por apoptosis) y la infección de células nuevas. La reducción, y eventualmente desaparición, de la viremia se logra por: a) disminución de la producción de partículas víricas en las células infectadas; b) disminución de la infección de células nuevas, y c) aumento de la destrucción de células infectadas.

Aproximadamente sólo la mitad de los pacientes con hepatitis crónica C que reciben medicación estándar con interferón (IFN) pegilado más ribavirina responden al tratamiento, con eliminación permanente de la viremia y remisión de la inflamación hepática. La resistencia al tratamiento se presenta en especial en la infección por los genotipos 1 y 4, y es más frecuente en pacientes con cirrosis¹. La falta de respuesta al tratamiento antivírico comporta la progresión de la enfermedad, con aumento de la fibrosis² y persistencia del riesgo carcinogénico. Dada la alta prevalencia de la hepatitis C, particularmente del genotipo 1, y la frecuente presencia de cirrosis en los pacientes que acuden para recibir tratamiento, se entiende que la resistencia al tratamiento antivírico constituye un problema de gran trascendencia sociosanitaria y que existe una gran urgencia para desarrollar tratamientos alternativos a la medicación hoy disponible (tabla 1).

El IFN despliega acciones antivíricas directas y estimuladoras de la respuesta inmunitaria. Por ello disminuye, por un lado, la producción de partículas víricas, y por otra parte aumenta la destrucción de las células infectadas al activar la respuesta inmunitaria contra los antígenos víricos presentes en ellas. Al inducir un estado antivírico en células no infectadas, el IFN impide también la infección de células nuevas. La ribavirina es un análogo sintético de guanósina que se fosforila en la célula y contribuye a reducir la concentración intracelular de guanosintrifosfato⁴. Se ha propuesto que la ribavirina es un mutágeno del ARN que induce un error catastrófico al sustituir a otros nucleótidos en la construcción de la cadena de ARN vírico⁵. Se ha postulado por ello que causa una disminución de la flexibilidad adaptativa de las

Trabajo realizado con las ayudas UTE, proyecto CIMA, Instituto de Salud Carlos III (C03/02) y SAF (2002-0327).

Correspondencia: Dra. L. Gil-Guerrero.
Clínica Universitaria y Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA).
Universidad de Navarra.
Avda. Pío, XII, 36. Pamplona 31008. España.
Correo electrónico: lugilgue@unav.es

Recibido el 4-10-2005; aceptado para su publicación el 20-1-2006.

TABLA 1

Nuevos fármacos en desarrollo para la hepatitis C

Nombre del fármaco	Promotor	Fase clínica	Comentario
Nuevos IFN			
Albúferón	Human Genome Sciences	II	IFN + albúmina. Liberación sostenida y prolongada
IFN consensus (inifergén)	InterMune	IV	IFN modificado. Aminoácidos de los 20 subtipos de IFN- α humano
Multiferón	Viragen	II	IFN- α humano de múltiples subtipos altamente purificado y natural
IFN- ω	Intarcia Therapeutics, Inc.	III	IFN tipo I recombinante
IFN- γ	Actimmune; InterMune	II	Un nuevo estudio piloto prueba su eficacia en combinación con IFN- α y ribavirina
IFN- α_5	DIGNA Biotech	Preclínica	Subtipo de IFN- α expresado en el hígado humano
Agentes inmunomoduladores			
Isatoribina (ANA245)	Anadys Pharmaceuticals	II	Agonista del TLR7
ANA975	Anadys Pharmaceuticals	I	Profármaco de ANA245
Actilón (CPG-10101)	Coley Pharmaceutical	II	Agonista del TLR9
Ceplene (dihidrocloruro de histamina)	Maxim Pharmaceuticals	II	Efecto inmunomodulador en asociación con el IFN pegilado
Zadaxin (timosina α_1)	Sci-Clone	III	Potencia la respuesta inmunitaria en combinación con IFN y ribavirina
Amantadina	Endo Labs Solvay	IV	Amplio espectro antivírico. Potencia los efectos del IFN
Vacunación terapéutica			
HCV/MF59	Chiron + CSL	I	Proteínas recombinantes del VHC más un adyuvante (Iscomatrix; CSL)
E1	Innogenetics	II	Proteína VHC E1 recombinante. Disminución de fibrosis hepática y transaminasas
IC41	Intercell	II	Péptido sintético del VHC junto con el adyuvante poli-L-arginina
Bloqueadores selectivos de las proteínas víricas			
VX-950	Vertex Pharmaceuticals	II	Inhibidor de la NS3-4A
Valopicitabina (NM283)	Idenix/Novartis	II	Inhibidor de la NS5B ARN polimerasa análogo de los nucleósidos
JTK-003	Akros Pharmaceuticals	II	Inhibidor no nucleósido de la NS5B ARN polimerasa
Celgosivir	Migenix	II	Bloqueador de la viropirina (P7)
Anticuerpos			
HepXtm-C (XLT-6865)	XTL	I/II	Reducción de la carga viral y prevención de recurrencia en trasplantados
Cicavir	Nabi	II	Prevención de recurrencia postrasplante
Productos alternativos			
Silimarina		I/II	Derivado del cardo mariano

IFN: interferón; TLR: receptor tipo Toll; VHC: virus de la hepatitis C; HCV E1: proteína 1 de la envoltura del VHC; NS3-4A: proteína no estructural 3-4A; NS5B: proteína no estructural 5B.

cuasiespecies del virus y una disminución de la infectividad de las partículas víricas, lo que contribuye a disminuir la infección de células nuevas y a hacer que las células infectadas sean menos evasivas a la respuesta inmunitaria celular.

Nuevas estrategias para potenciar la acción del interferón

La evasión del virus de la hepatitis C al interferón

Hay 2 tipos de IFN: el tipo I, que incluye el IFN- α y el IFN- β , y el tipo II, que corresponde al IFN- γ (fig. 1). Este último tiene acción proinflamatoria y también antivírica, pero no ha mostrado eficacia en el tratamiento de la hepatitis C. El IFN usado en clínica para el tratamiento de la hepatitis vírica es el IFN- α . Esta molécula se une a un receptor de la membrana celular compuesto por 2 subunidades: IFNAR1 e IFNAR2⁶. El IFNAR2 tiene 3 formas de procesamiento (a, b y c), de las cuales la IFNAR2c es la que participa en la unión al ligando y en la transducción de la señal, mientras las otras 2 pueden bloquear la señalización por IFN- α ⁷. La traducción de la señal del IFN- α está mediada por Jak1 (cinasa Janus 1) y Tyk2 (cinasa asociada al receptor de IFN), las cuales fosforilan y activan las proteínas STAT1, STAT2 y STAT3 (proteínas transductoras de señal y activadoras de transcripción de genes estimulados por IFN). Tras la fosforilación STAT1 y STAT2 forman un heterodímero que junto con IRF9 (factor regulador del IFN-9) forma un complejo que actúa como factor de transcripción (llamado ISGF3) que estimula la expresión de los genes inducibles por IFN- α como la cinasa serina-treonina PKR, la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (2',5'-OAS) y la guanosina trifosfatasa MxA y P56⁸. Las proteínas PKR y P56 inactivan a los factores de iniciación, eIF2 y eIF3, respectivamente, y consiguientemente se inhibe la síntesis de las proteínas víricas y celulares.

STAT1 y STAT3 pueden formar homodímeros o heterodímeros STAT1-STAT3, que también se translocan al núcleo para modular la expresión de genes. Está bien documentado que la activación de STAT1 y STAT2 es esencial para la acción antivírica del IFN y también se ha mostrado que la activación de STAT3 es necesaria para que el IFN- α ejerza su efecto antivírico⁹. El IFN tipo II, tras unirse a un receptor específico, activa STAT1 a través de Jak1 y Jak2, lo que se sigue de la homodimerización de STAT1 y de la translocación nuclear del homodímero¹⁰. Las citocinas hepatoprotectoras de la familia de la interleucina 6 (IL-6) como la propia IL-6 o la cardiotrofina 1 (al actuar a través de un receptor específico que contiene la subunidad gp130) también activan STAT1 y STAT3 promoviendo su translocación al núcleo.

Estudios recientes han puesto de manifiesto diversos mecanismos de evasión del VHC al IFN. Se ha observado que los valores de ARN mensajero de IFN- α están notablemente reducidos en el hígado de pacientes con hepatitis crónica C, cuando lo esperable sería un aumento de la expresión de IFN¹¹. Este hecho ejemplifica cómo el VHC atenúa la respuesta interferónica en el órgano que infecta. Por otra parte, diversos trabajos que han usado sistemas *in vitro* han señalado que las proteínas del VHC pueden interferir con la vía Jak-STAT de señalización del IFN- α . Así, se ha visto que la proteína NS3-4A del virus inhibe la inducción del IFN- α por el IRF3¹² y que la proteína E2 bloquea el gen *PKR* inducido por el IFN- α al tener homología en sus sitios de fosforilación con el eIF2- α , que es el sustrato de *PKR*¹³. Por otra parte, la proteína NS5 (proteína no estructural 5) interacciona con el dominio catalítico de *PKR* y bloquea su actividad¹⁴. Un estudio reciente¹⁵ ha mostrado que en el hígado de pacientes con hepatitis C los valores de STAT3 total están descendidos y se aprecia una disminución de STAT3 fosforila-

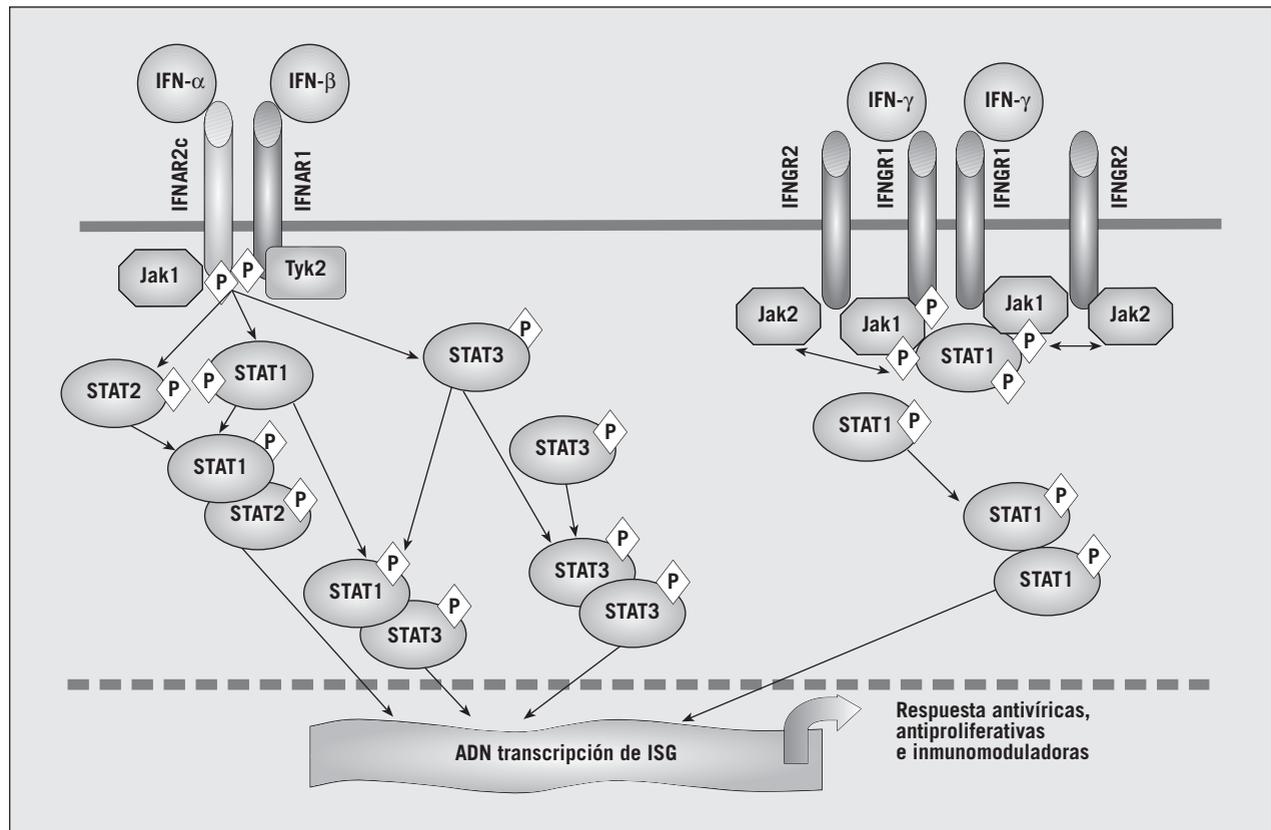


Fig. 1. Vías de señalización del interferón (IFN). Los IFN se unen a receptores celulares específicos y desencadenan respuestas antivíricas, antiproliferativas e inmunorreguladoras (IFN tipo I, que incluye el IFN- α y el IFN- β) o proinflamatorias y también antivíricas (IFN tipo II o IFN- γ). El IFN- α se une a un receptor de la membrana celular compuesto por 2 subunidades: IFNAR1 e IFNAR2. La traducción de la señal del IFN- α está mediada por la cinasa Janus tipo 1 (Jak1) y por la cinasa asociada al receptor del IFN tipo 2 (Tyk2), las cuales fosforilan y activan las proteínas STAT1, STAT2 y STAT3 (transductoras de señal y activadoras de la transcripción). Tras la fosforilación STAT1 y STAT2 forman un heterodímero que estimula la expresión de genes que inhiben la síntesis de las proteínas víricas y celulares. STAT1 y STAT3 pueden formar homodímeros o heterodímeros STAT1-STAT3, que también se translocan al núcleo para modular la expresión de genes. El IFN tipo II, tras unirse a un receptor específico, activa STAT1 a través de Jak1 y Jak2, lo que se sigue de la homodimerización de STAT1 y de la translocación nuclear del homodímero. IFNGR: receptor del IFN- γ ; P: fosfato; ISG: genes estimulados por IFN; VHC: virus de la hepatitis C.

da en el núcleo de los hepatocitos. Además, en las biopsias hepáticas de pacientes con infección crónica por el VHC está descendida la expresión de la subunidad IFNAR2c del receptor del IFN y no se detecta STAT2 fosforilada¹⁵. Un hecho interesante es que en células Huh7 en las que se replica el genoma entero del VHC está inhibida la fosforilación de STAT3 inducida por IFN- α o por las citocinas de la familia de la IL-6, así como la fosforilación de STAT2 y STAT1 tras estimulación con IFN- α ¹⁵. Este trabajo aporta evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* de que el VHC actúa bloqueando muy eficientemente la acción del IFN- α . Poder soslayar la barrera que el virus establece dentro de la célula frente a la acción del IFN es una de las metas de los nuevos diseños terapéuticos en el futuro.

Mejora en la farmacocinética del interferón

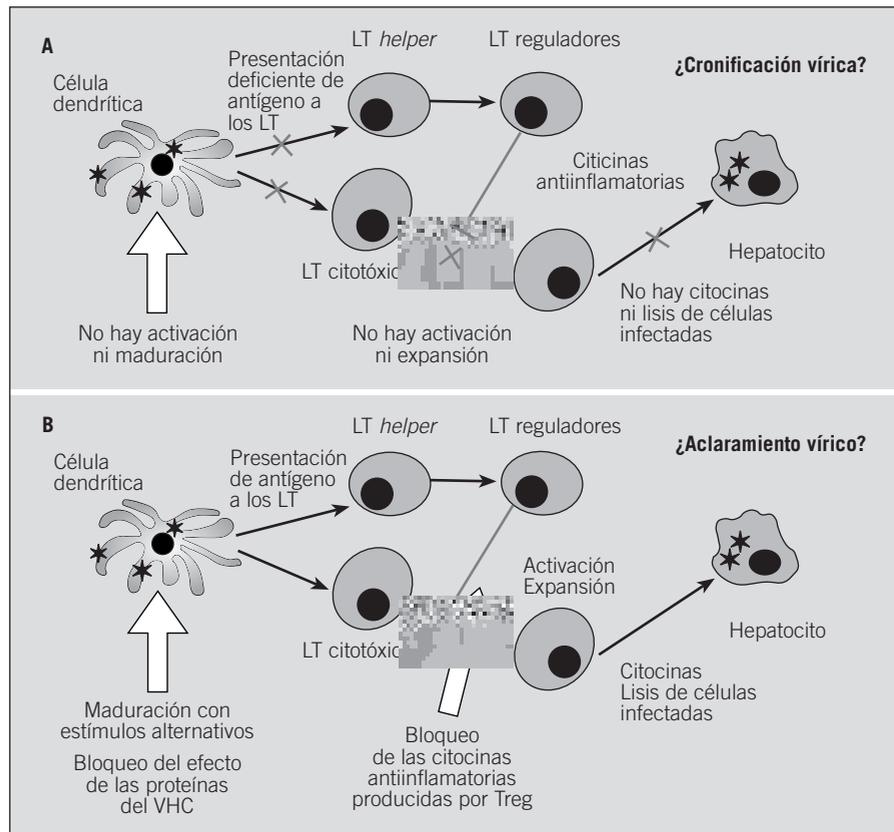
La modificación de la molécula del IFN mediante procedimientos como la pegilación (peginterferón) o la unión a albúmina (albuferón)¹⁶ ha permitido mantener concentraciones altas de IFN en sangre de modo sostenido durante una semana, y esta mejora de la farmacocinética ha comportado una mayor eficacia antivírica y un aumento del número de respuestas. Sin embargo, como queda dicho, la tasa de resistencia al tratamiento combinado de ribavirina más peginterferón sigue siendo elevada en infecciones por genotipos 1 y 4, y parece que la mera modificación de la farmacociné-

tica del IFN (mediante nuevos sistemas de liberación, como bombas de infusión implantables, liberación controlada desde una matriz polimérica inyectable o dispositivos subcutáneos o intramusculares)¹⁷ no va a permitir ulteriores mejoras sobre la tasa de respuesta actual. Por otro lado, se ha visto que la utilización de dosis de peginterferón mayores que las habituales puede incrementar la tasa de respuestas en los pacientes que no responden al tratamiento, pero este aumento es muy modesto¹⁸.

Nuevos interferones

Existen unos 20 subtipos de IFN- α humano. De ellos sólo el subtipo 2 está disponible comercialmente para uso terapéutico. Con el fin de mejorar las propiedades antivíricas del IFN se han realizado cambios en la secuencia de la molécula introduciendo en cada dominio de la proteína los aminoácidos más comunes en los 20 subtipos. Este IFN modificado, denominado IFN consenso, despliega *in vitro* una acción antivírica más potente. Sin embargo, en ensayos clínicos sólo ha logrado un 8% de respuestas sostenidas en pacientes resistentes a tratamientos previos con IFN¹⁹. Siguiendo una lógica similar se están realizando ensayos con un IFN- α humano de múltiples subtipos altamente purificado y natural (obtenido a partir de leucocitos, y no de tecnología recombinante). El multiféron ha demostrado ser efectivo en diferentes procesos neoplásicos y su uso tera-

Fig. 2. Mecanismos por los cuales el virus de la hepatitis C (VHC) escapa a la respuesta inmunitaria y posibles estrategias inmunoterapéuticas. A: la infección de las células dendríticas (CD) por el VHC impide su maduración y consiguiente activación para la correcta estimulación de los linfocitos T (LT). Esto hace, por un lado, que los LT CD4+ adquieran un fenotipo de LT reguladores (Treg), con efecto inmunodepresor y capaces de producir citocinas antiinflamatorias, y por otro lado impide la activación de los LT citotóxicos, que deberían producir citocinas proinflamatorias y lisis las células infectadas como los hepatocitos. B: las estrategias inmunoterapéuticas para el tratamiento de la infección por el VHC deberían activar las CD a través de estímulos alternativos, o bien bloquear los efectos inmunomoduladores de las proteínas víricas dentro de estas células, lo que permitiría una correcta activación de los LT. Además, el bloqueo de las citocinas antiinflamatorias producidas por los Treg permitiría potenciar la respuesta, lo que finalmente podría llevar al aclaramiento vírico.



péutico está aprobado en algunos países para el tratamiento de las leucemias. Actualmente los ensayos relacionados con el VHC se encuentran en fase II.

Los ensayos clínicos con el IFN- ω , una forma de IFN tipo 1 recombinante, se encuentran en fase III, y además la compañía estudia nuevas formas para vehicular el fármaco, como el implante subcutáneo de titanio que permite la liberación sostenida del IFN- ω durante semanas o incluso meses²⁰.

Aunque los ensayos con el IFN- γ en monoterapia obtuvieron resultados decepcionantes, un nuevo estudio piloto prueba su eficacia en combinación con IFN- α y ribavirina²¹.

De los 20 subtipos de IFN- α , en el hígado humano sólo se expresa el IFN- α_5 ¹¹. Este hecho puede significar que el subtipo IFN- α_5 posee unos efectos biológicos no compartidos por los demás. Es interesante el hecho de que un estudio de Larrea et al²² ha mostrado que el IFN- α_5 induce una activación de STAT-1 y de la vía Tyk-2/STAT3 más potente que el IFN- α_2 . Estos resultados subrayan la conveniencia de realizar ensayos clínicos con IFN- α_5 más ribavirina.

Nuevas estrategias para potenciar la respuesta inmunitaria antivírica

El VHC escapa a la respuesta inmunitaria

La respuesta inmunitaria antivírica se inicia con la presentación por las células dendríticas (CD) de péptidos derivados del procesamiento de proteínas víricas a los linfocitos T. La interacción del receptor TCR de los linfocitos T con el péptido presentado en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de las CD (MHC de clase II para linfocitos CD4 y MHC clase I para CD8), junto con señales de coestímulo (B7 presente en la CD que interacciona con

CD28 del linfocito T y CD40 de la CD que interacciona con CD40L del linfocito T activado), pone en marcha una serie de reacciones que llevan a la CD a madurar, producir citocinas inmunoestimuladoras como IL-12 y migrar hasta el ganglio linfático, donde activa los linfocitos CD4 y CD8 específicos para el antígeno, con lo que se amplifica la respuesta inmunitaria.

La eliminación permanente del VHC tras una infección aguda o tras el tratamiento con IFN se asocia a la generación de una respuesta inmunitaria potente y multispecífica (es decir, frente a múltiples epítopes de las proteínas víricas) de los linfocitos CD4 y CD8, mientras que la falta de respuesta al tratamiento con IFN se asocia a respuestas débiles frente a muy escasos epítopes^{22,23}. La pobreza de la reactividad inmunitaria antivírica específica que se observa en la infección crónica por el VHC, y en especial en los pacientes que no responden al tratamiento con IFN, indica que el virus es capaz de manipular los mecanismos de inducción de la respuesta inmunitaria desviándola en el sentido de la tolerancia.

El VHC, además de infectar a hepatocitos, tiene un reservorio extrahepático que incluye a los linfocitos B y a las CD. Estudios de Sarobe et al^{24,25} han puesto de manifiesto que la presencia de proteínas víricas, principalmente VHCcore+E1, en la CD provoca una disfunción de ésta que la incapacita para inducir la activación completa de los linfocitos CD4. La CD que expresa VHCcore+E1 no es capaz de experimentar el proceso de maduración normal tras recibir la estimulación vía CD40-CD40L²² y los linfocitos CD4 estimulados por ella expresan CD25 (un componente del receptor para IL-2), pero no llegan a producir IL-2, adquiriendo un fenotipo (CD4+ CD25+) que corresponde al de las células T reguladoras con acción inmunodepresora (fig. 2).

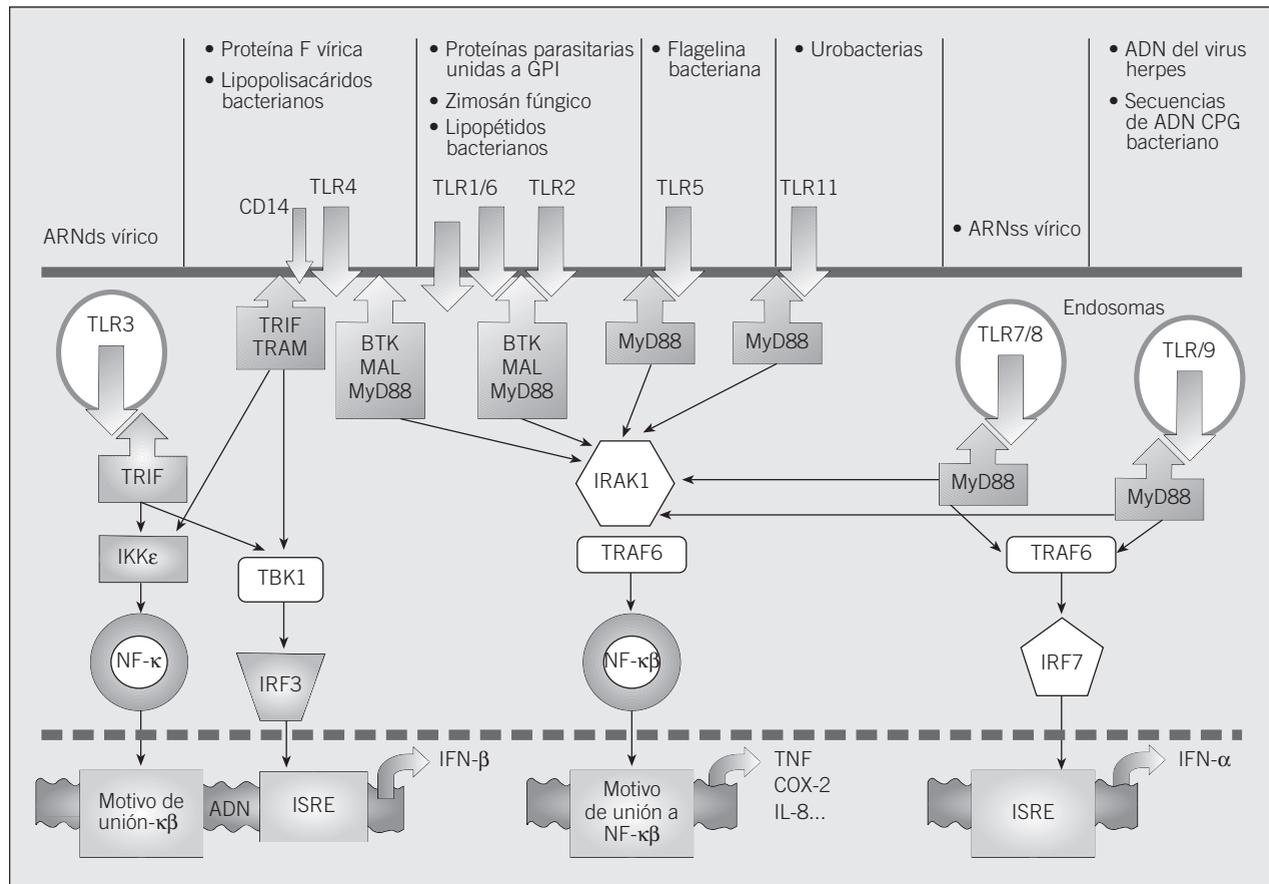


Fig. 3. La familia de los receptores tipo Toll (TLR). Los TLR reconocen productos microbianos y activan vías de señalización que promueven la expresión de genes de la respuesta inmunitaria e inflamatoria, por lo que constituyen la primera línea de la respuesta innata frente a patógenos. Los TLR más específicamente antivíricos (TLR3 y TLR7-9) reconocen ácidos nucleicos y señalizan desde endosomas, mientras que el resto (TLR1, 2, 10 y 11, y TLR4-6) se sitúan en la membrana celular y detectan lípidos y proteínas. La vía activada por la mayoría de los TLR desemboca en la activación del factor de transcripción nuclear kappa-pa-beta (NF-κβ), con lo que se producen citocinas esenciales para la defensa antimicrobiana como el factor de necrosis tumoral (TNF), la ciclooxigenasa 2 (COX-2) o la interleucina (IL) 18. TLR3 y TLR4 activan una vía alternativa que actúa tanto sobre NF-κβ como sobre el factor regulador 3 del interferón (IRF3), lo que permite la expresión de productos antivíricos adicionales como el interferón (IFN) beta. MAP: proteína activada por mitógenos; ARNs: ARN bicatenario; ARNs: ARN monocatenario; VRS: virus respiratorio sincitial; GPI: glucosilfosfatidilinositol; CPG: finucleótido citosinaguanosina no metilado; TRIF: receptor [TOLL] interleucina-1; TRAM: adaptador que contiene el dominio Tir; MAL: proteína semejante al adaptador M y D88; M y D88: adaptador del factor de diferenciación mieloide 88; IKK: complejo cinasa cinasa κβ; TBK: cinasa de fijación TANK activadora de NF-κβ asociada a la familia TRAF, IRAK: cinasa asociada a la interleucina-1R; TRAF: receptor del factor de necrosis tumoral; ISRE: elemento regulador estimulado por el IFN.

Hoy día parece claro que la curación definitiva de la infección por el VHC pasa por la generación de una respuesta vigorosa y polivalente de los linfocitos CD4 frente a las proteínas del VHC. Por ello es necesario poner a punto métodos de vacunación que venzan los mecanismos tolerogénicos inducidos por el VHC como alternativa terapéutica para los pacientes que no responden al tratamiento con IFN.

Agentes inmunomoduladores

La eliminación del VHC se acompaña de la inducción de una vigorosa respuesta inmunitaria celular dirigida contra diversos epitopes de proteínas víricas. Esta respuesta inmunitaria curativa precisa la activación inicial de la inmunidad innata, que actúa como motor de arranque de la respuesta adaptativa. El VHC ha desarrollado sistemas de evasión tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa, y ésta es una de las razones de su éxito como patógeno causante de infección crónica. Teniendo en cuenta el papel crucial de la respuesta inmunitaria en la curación de la infección por el VHC, se están ensayando distintas estrategias para provocar la eliminación inmunitaria del virus.

En 1998 se identificó el primer miembro de una familia de proteínas llamadas receptores tipo Toll (TLR), que son expresadas por macrófagos, monocitos, CD y linfocitos B y que reconocen motivos moleculares propios de patógenos, tales como virus, bacterias y parásitos (fig. 3). Estos patrones moleculares de agentes invasivos que son reconocidos por los TLR se denominan PAMP o patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*). La interacción de los TLR con los PAMP da lugar a activación celular con producción de citocinas proinflamatorias y antivíricas. La estimulación de los TLR de las CD inicia una cascada de señales a través de distintas proteínas adaptadoras (MyD88, MAL/TIRAP, TRAM y TRIF) e induce la maduración de la CD capacitándola para activar la respuesta inmunitaria celular adaptativa^{26,27}. Existen al menos 11 TLR en el ser humano (de TLR1 a TLR11). Los TLR 3, 7 y 9 son los más relacionados con la detección de motivos moleculares de los virus, y en respuesta a su activación se producen citocinas esenciales para la defensa antivírica como el factor de necrosis tumoral, la IL-12 y el IFN tipo I²⁸. En estudios recientes se ha comprobado que el VHC es capaz de eludir este sistema

desactivando algunas de las vías madurativas de las CD^{25,29}. En la actualidad se están desarrollando distintas moléculas agonistas de los TLR para tratar de aumentar la función inmunoestimuladora de las CD y así obviar los mecanismos de evasión del VHC.

Entre los fármacos estimuladores de los TLR está el ANA245 o isatoribina, un agonista del TLR7 que, administrado por vía intravenosa diariamente durante una semana, se ha mostrado capaz de reducir la carga viral significativamente y de aumentar los marcadores de activación inmunitaria independientemente del genotipo vírico. Los ensayos se encuentran en fase II, y los de su profármaco ANA975 (vía oral) en fase I³⁰.

El CPG-10101 es un agonista del TLR9 que también ha producido descensos significativos de la carga viral. Se administra de forma subcutánea y se encuentra en fase II³¹.

Aparte de los agonistas TLR, se están ensayando otros inmunomoduladores en asociación con el IFN, tales como el dihidrocloruro de histamina (ceplene) y la timosina α_1 (zadaxin). Esta última está ensayándose en fase III junto con IFN y ribavirina por su efecto sobre la activación de las células del sistema inmunitario y la producción de citocinas. La amantadina es un fármaco con amplio espectro antivírico, aprobado para el tratamiento de la gripe, que parece potenciar los efectos del IFN. Los estudios se encuentran en fase IV³²⁻³⁴.

La vacunación terapéutica

Con el fin de inducir repuestas inmunitarias frente a los antígenos víricos se han utilizado: a) proteínas recombinantes; b) vacunas génicas, o c) CD autólogas pulsadas con el antígeno o transducidas con un vector que exprese el antígeno vírico. Estudios recientes han comprobado que la administración de la proteína E1 de la envoltura del VHC consigue estimular la respuesta inmunitaria humoral y celular contra este antígeno vírico en sujetos sanos. Sin embargo, cuando esta vacuna se administra a pacientes con infección crónica por el VHC, se obtiene un descenso de la cifra de transaminasas, pero no se observan cambios en la viremia³⁵. HCV/MF59 es otra vacuna terapéutica desarrollada por Chiron y compuesta por proteínas recombinantes de VHC más adyuvante (iscomatrix). En fase I esta vacuna ha mostrado actividad frente a todos los genotipos y capacidad de inducir inmunidad humoral y celular con mínimos efectos secundarios³⁶. También se están realizando intentos de inmunoterapia con IC41, un péptido sintético del VHC identificado a partir de estudios realizados en pacientes con inmunidad natural frente al VHC o con buenas respuestas al tratamiento. Los ensayos con este inmunógeno, administrado junto con el adyuvante poli-L-arginina, han completado ya las fases I y II, y han demostrado que en pacientes con hepatitis crónica por el VHC resistente al tratamiento convencional presenta un buen perfil de seguridad e induce un aumento de la respuesta de las células T y una reducción transitoria de la carga viral³⁷.

Los adenovirus son vectores particularmente útiles para la inducción de respuestas inmunitarias. Estudios en nuestro laboratorio han mostrado que la administración a ratones de un adenovirus de primera generación que codifica para NS3 (una proteína no estructural frente a la que se observa una fuerte reactividad en los pacientes con hepatitis C que curan tras el tratamiento) induce una vigorosa respuesta celular y protección frente a la infección por el virus *vaccinia* recombinante que expresa todas las proteínas del VHC³⁸. Esta respuesta inmunitaria y el efecto protector aumentan sustancialmente si a la inyección del adenovirus que contiene

NS3 se añade la administración de un anticuerpo monoclonal inmunoestimulador dirigido contra CD137, una molécula de superficie de los linfocitos T³⁹.

Otro procedimiento prometedor para la inducción de respuestas inmunitarias es la vacunación con CD autólogas ingenierizadas con adenovirus que expresan proteínas del VHC (p. ej., NS3) y que luego maduran *in vitro* y se administran mediante inyección subcutánea o dentro del propio ganglio linfático.

Los resultados mencionados constituyen un estímulo para la realización de estudios clínicos piloto en los que se apliquen pautas de inmunoterapia (que se hayan mostrado eficientes y seguras en modelos de ratón y primates) en pacientes resistentes al tratamiento habitual que presenten enfermedad activa no susceptible de otras opciones terapéuticas.

Otras estrategias para inhibir la replicación vírica

Bloqueadores selectivos de las proteínas víricas

La resolución de la estructura cristalina de varias de las proteínas del VHC ha permitido el desarrollo de pequeñas moléculas con capacidad de inhibir la actividad de las enzimas víricas o de bloquear proteínas estructurales del virus. Las dianas preferentes han sido la NS3 serina-proteinasa y la NS5B ARN polimerasa.

Inhibidores de la NS3 proteasa

Uno de los primeros compuestos desarrollados fue el BILN 2061, un inhibidor de NS3-4A capaz de producir un descenso significativo de la viremia después de sólo 2 días de tratamiento⁴⁰. Desafortunadamente la aparición de toxicidad cardíaca en los estudios toxicológicos en animales ha llevado a interrumpir su desarrollo clínico. La toxicidad es el único problema de este compuesto. En el modelo del replicón se pudo observar una rápida aparición de resistencias a este fármaco: bastaba una sola mutación causante de la sustitución de un aminoácido por otro en el dominio de la NS3 proteasa para que el virión se hiciera resistente al BILN 2061. Estos datos *in vitro* y la gran mutabilidad del VHC predicen la aparición precoz de resistencias en los pacientes que reciben tratamiento con este inhibidor de la proteasa del virus.

Un prometedor inhibidor de la NS3-4A es el VX-950. Este compuesto es un peptidomimético bloqueador de la proteasa que lleva una cetoamida que a modo de ancla es capaz de establecer un enlace covalente reversible con la serina del sitio activo de la proteasa. Esta propiedad, sin embargo, no le confiere protección frente al desarrollo de resistencias. En ensayos de fase II ha mostrado que aparentemente posee un buen perfil de seguridad y que es capaz de producir una sustancial reducción de la viremia⁴¹. Se han programado ensayos en los que se estudiará su acción antivírica en combinación con el IFN pegilado.

Inhibidores de la polimerasa

La actividad polimerasa dependiente del ARN, correspondiente a la proteína NS5B, es el componente catalítico de la maquinaria de replicación del ARN del VHC y puede ser inhibida tanto por análogos de nucleósidos como por no nucleósidos. Los primeros actúan como sustratos de la ARN polimerasa terminando la síntesis del ARN vírico. Los segundos inducen cambios alostéricos en la enzima impidiendo su disposición en la conformación en la que es activa. Los análogos de nucleósidos y los no nucleósidos inducen distintos tipos de resistencias y por ello es concebible que

ambas variedades de inhibidores puedan utilizarse de forma combinada para reducir la aparición de mutantes resistentes.

El principal representante de los análogos de los nucleósidos es la valopicitabina (NM283), que tras haberse mostrado activa en el chimpancé⁴² se ha utilizado en ensayos de fase II, donde se han observado una buena tolerancia y disminución modesta de la carga viral⁴³. En la actualidad está en marcha un ensayo para comparar la eficacia de NM283 en combinación con IFN pegilado frente al tratamiento estándar (IFN pegilado y ribavirina). En 2006 está previsto comenzar un estudio más amplio de fase III.

Entre los inhibidores no nucleósidos de la polimerasa destaca el JTK-003⁴¹. Recientemente han comenzado los estudios en fase II con este fármaco, centrados en el tratamiento de la infección por el VHC genotipo 1.

Bloqueadores de la viroporina

La proteína P7 del VHC tiene capacidad de formar canales iónicos, y se han desarrollado fármacos para bloquearla. El celgosivir parece tener un prometedor perfil de actividad^{44,45}, y ya están en marcha ensayos de fase II tanto en monoterapia (en pacientes no tratados o intolerantes al IFN) como en combinación con IFN.

Consideraciones en torno al uso de agentes inhibidores de las proteínas víricas

Son varios los problemas que hay que tener presentes en relación con los fármacos bloqueadores de las proteínas del VHC. El primero es su potencial toxicidad en tratamientos prolongados. El segundo es que están diseñados para bloquear una proteína vírica de un aislado específico del VHC y, dado que este virus posee una gran variabilidad genética, es predecible la aparición de resistencias. En relación con los inhibidores de la NS3-4A proteasa, se ha visto en el modelo del replicón que aparecen con facilidad resistencias cruzadas a varios inhibidores peptidomiméticos, por lo que es posible que la combinación de antiproteasas no sea de utilidad clínica. Finalmente, los inhibidores de las proteínas del VHC no actúan estimulando la respuesta inmunitaria antivírica específica (como lo hace el IFN), y sin ello no se podrá conseguir una eliminación persistente de la infección. Es posible que la combinación de los inhibidores selectivos de la replicación vírica con inmunomoduladores o con pautas de vacunación terapéutica ofrezca alternativas eficaces para combatir la infección por el VHC.

La aportación de la terapia génica

Este procedimiento terapéutico consiste en la introducción de material genético en las células con objeto de inducir en ellas la síntesis de una proteína de función curativa o de reprimir la expresión de un gen de efecto patógeno. Para permitir la entrada de las moléculas de ADN al interior de la célula se utilizan los llamados vectores de terapia génica, que son construcciones moleculares que facilitan la penetración de los genes en ellas contenidos a través de la membrana celular para hacer que lleguen al núcleo donde tiene lugar su expresión. Los vectores de terapia génica más frecuentemente usados se basan en partículas de virus modificados por eliminación de parte (o todos) de sus genes y su sustitución por el gen/es terapéutico/s.

Hay diversos tipos de vectores víricos, entre los que se incluyen los adenovirus, los virus adenoasociados, los retrovirus y los virus herpes. Los adenovirus son vectores que persisten en forma episómica y se han utilizado ampliamente

en diversos ensayos clínicos. Los vectores adenovíricos de primera generación carecen de los genes *E1* y *E3* y mantienen el resto del genoma del adenovirus; son de corta expresión en el tiempo y no permiten tratamientos prolongados. Los adenovirus de tercera generación, también llamados de alta capacidad, son partículas víricas que carecen de todo el genoma adenovírico, excepto los fragmentos invertidos terminales (conocidos como ITR). Estos vectores son de larga expresión y es posible hacer tratamientos de más de un año⁴⁶. Los virus adenoasociados son virus de escasa capacidad pero de larga expresión, que persisten en la célula en parte en forma episómica y en parte en forma integrada. Los retrovirus son virus ARN que se integran en el genoma de la célula, lo que comporta una larga expresión y transmisión de su información genética a la descendencia celular. Con estos vectores existe, sin embargo, el riesgo de transformación tumoral por la posibilidad de mutación insercional o activación de oncogenes por el fragmento largo terminal retroviral.

La transducción de las células hepáticas con vectores de larga expresión que contienen el gen del IFN- α es una estrategia atractiva y prometedora que se ha explorado en estudios recientes. Convertir el hígado en una fábrica que produzca IFN de modo regulable tiene la ventaja de concentrar la acción del fármaco en el órgano diana manteniendo valores periféricos más bajos y, por tanto, de incrementar la actividad terapéutica con menos efectos secundarios. En la terapia génica de la hepatitis vírica se han ensayado principalmente adenovirus de alta capacidad⁴⁷ y virus adenoasociados⁴⁸ en el modelo de infección crónica por el virus de la hepatitis de la marmota. Los resultados obtenidos en estos estudios han sido modestos debido, en parte, a la dificultad de inhibir la replicación vírica en la hepatitis de la marmota, que cursa con viremia muy alta, y en parte por el hecho de que las células transducidas por el vector se eliminan en pocas semanas, por lo que resulta imposible mantener unas concentraciones sanguíneas sostenidas de IFN durante tiempo suficiente⁴⁸. Es necesario conocer los mecanismos que impiden una transducción estable del hígado con vectores que expresen IFN- α antes de que este procedimiento terapéutico pueda contemplarse para aplicaciones clínicas. La terapia génica de la hepatitis vírica C puede abordarse también con genes distintos del IFN- α , como el de la IL-12, que puede utilizarse para estimular la respuesta inmunitaria antivírica⁴⁹, o con genes que bloqueen la replicación vírica como la interferencia por ARN usando ARNsh dirigidos frente a dianas víricas específicas⁵⁰. Esta última estrategia, aunque atractiva, tiene el inconveniente de que sería preciso transducir un porcentaje muy alto de hepatocitos, lo que es difícil con los vectores actualmente disponibles. Por otra parte, la gran mutabilidad del VHC es la causa de la aparición de resistencias frente al tratamiento con ARN de interferencia. Es posible que el uso simultáneo de varios ARNsi (o ARNsh) contra dianas víricas diferentes consiga paliar las resistencias a este tratamiento.

Nuevos fármacos para reducir la infección *de novo*

Anticuerpos

La administración de anticuerpos monoclonales, como HepXtm-C (XLT-6865), ha logrado reducir la carga vírica en estudios de fase I, y se están realizando ensayos de fase II en pacientes con infección por el VHC receptores de trasplantes para prevenir la recurrencia⁵¹. Las inmunoglobulinas hiperinmunitarias anti-VHC, como el cicavir, también se están estudiando con este fin⁴¹.

Productos alternativos

Diversos remedios procedentes de la medicina tradicional china o productos naturistas como extractos tímicos, derivados de la raíz del regaliz o del cardo mariano, se han propuesto como tratamientos efectivos para las hepatitis crónicas por el VHC. Los datos sobre su eficacia y seguridad suelen ser muy limitados y poco fiables, pero recientemente se han iniciado estudios en fase I/II sobre el cardo mariano (cuyo agente activo es la silimarina) que aclararán si este producto presenta algún tipo de efecto terapéutico⁵².

Conclusiones

La mitad de los pacientes con infección crónica por el VHC no responde al tratamiento estándar. La resistencia afecta especialmente a los que presentan cirrosis y a los infectados por los genotipos 1 y 4. En el momento actual no disponemos de recursos terapéuticos para evitar la progresión de la enfermedad en estos casos. El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas depende en parte del conocimiento de los mecanismos por los que el VHC evade la acción del IFN y del sistema inmunitario. Es necesario ensayar en pacientes rebeldes al tratamiento disponible procedimientos alternativos basados en pautas de vacunación terapéutica o en la utilización de nuevas moléculas de IFN o combinación de citocinas. Los fármacos inhibidores de enzimas víricas (proteasa, helicasa o ARN polimerasa) son sustancias prometedoras, pero en monoterapia carecen de la capacidad de inducir respuesta inmunitaria antivírica, sin la cual no hay eliminación de la infección, por lo que son precisos tratamientos prolongados, con el riesgo de toxicidad o de aparición de resistencias. La terapia génica es un procedimiento terapéutico prometedor, pero aún no disponemos de vectores capaces de inducir una reducción estable de la viremia en modelos animales.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. M. Pilar Civeira y al Dr. Juan José Lasarte por su contribución en la elaboración del manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Romero-Gómez M, Vitoria MM, Andrade RJ, Salmeron J, Diago M, Fernández-Rodríguez, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology*. 2005;128:636-41.
- Galaras JA, Cirera I, Coll S, Jiménez MD, Márquez C, Bory F, et al. Long-term follow-up of chronic hepatitis C patients non-responders to antiviral treatment. *Hepatology*. 2003;38:442A.
- Neuman AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. 1998;282:103-7.
- Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z. Mechanisms of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology*. 2002;35:1002-9.
- Crotty S, Cameron CE, Andino R. The broad spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med*. 2000;6:1375-9.
- Pestka S. The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers*. 2000;55:254-87.
- Pfeffer LM, Basu L, Pfeiffer SR, Yang CH, Murti A, Russell-Harde D, et al. The short form of the interferon alpha/beta receptor chain 2 acts as a dominant negative for type I interferon action. *J Biol Chem*. 1997;272:11002-5.
- David M. Signal transduction by type I interferons. *Biotechniques* 2002 [Suppl];33:58-65.
- Yang CH, Murti A, Pfeffer LM. STAT3 complements defects in an interferon-resistant cell line: evidence for an essential role for STAT3 in interferon signaling and biological activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:5568-72.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:227-64.
- Castelruiz Y, Larrea E, Boya P, Civeira MP, Prieto J. Interferon alpha subtypes and levels of type I interferons in the liver and peripheral mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C and controls. *Hepatology*. 1999;29:1900-4.
- Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*. 2003;300:1145-8.
- Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*. 1999;285:107-10.
- Gale MJ, Korth MJ, Katze MG. Repression of the PKR protein kinase by hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diag Virol*. 1998;10:157-62.
- Larrea E, Aldabe R, Molano E, Fernández-Rodríguez CM, Ametzazurra A, Civeira MP, et al. Altered expression and activation of STATs (signal transduction and activator of transcription) in HCV infection: *in vivo* and *in vitro* studies. *Gut* 2005. Disponible en: <http://gut.bmjournals.com/cgi/content/abstract/gut.2005.070060v1>
- Masci P, Bukowski RM, Patten PA, Osborn BL, Borden EC. New and modified interferon alphas: preclinical and clinical data. *Curr Oncol Rep*. 2003;5:108-13.
- Pockros PJ. Developments in the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opin Invest Drugs*. 2002;11:515-28.
- Pawlotsky JM. Current and future concepts in hepatitis C therapy. *Sem Liver Dis*. 2005;25:72-83.
- Moskowitz DN, Manoharan P, Heathcote EJ. High dose consensus interferon in nonresponders to interferon alpha-2b and ribavirin with chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol*. 2003;17:479-82.
- Pawlotsky JM, McHutchison JG. Hepatitis C. Development of new drugs and clinical trials: promises and pitfalls. Summary of an AASLD hepatitis single topic conference. *Hepatology*. 2004;39:554-67.
- Leevy C, Blatt LM, Chalmers C. Interim results of a pilot study of the combination of type 1 (IFN alfacon 1) and type 2 (IFN gamma 1b) interferons in chronic hepatitis C patients who have failed to respond to peginterferon alfa-2a plus ribavirin. *Hepatology*. 2004;40 Suppl 1:394A.
- Larrea E, Aldabe R, Riezu-Boj JI, Guitart A, Civeira MP, Prieto J, et al. IFN-alpha5 mediates stronger Tyk2-stat-dependent activation and higher expression of 2',5'-oligoadenylate synthetase than IFN-alpha2 in liver cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2004;24:497-503.
- Lasarte JJ, García-Granero M, López A, Casares N, García N, Civeira MP, et al. Cellular immunity to hepatitis C virus core protein and the response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1998;28:815-22.
- Sarobe P, Jauregui JI, Lasarte JJ, García N, Civeira MP, Borrás-Cuesta F, et al. Production of interleukin-2 in response to synthetic peptides from hepatitis C virus E1 protein in patients with chronic hepatitis C: relationship with the response to interferon treatment. *J Hepatol*. 1996;25:1-9.
- Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribalaga L, Arina A, Melero I, et al. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit *in vivo* induction of cellular immune responses. *J Virol*. 2003;77:10862-71.
- Beutler B. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signaling. *Nature*. 2004;430:257-71.
- Bowie AG, Haga IR. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol*. 2004;42:859-67.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature*. 2004;4:499-511.
- Li K, Foy E, Ferreon J, Nakamura M, Ferreon A, Ikeda M, et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:2992-7.
- Horsmans Y, Berg T, Desager JP, Mueller T, Schott E, Fletcher SP, et al. Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology*. 2005;42:724-31.
- Bayes M, Rabasseda X, Prous JR. Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2005;27:193-219.
- Lurie Y, Nevens F, Aprosina ZG, Fedorova TA, Kalinin AV, Klimova EA, et al. A multicenter randomized study to evaluate the safety and efficacy of histamine dihydrochloride and interferon alpha-2b for the treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepatol*. 2002;9:346-353.
- Andreone P, Gramenzi A, Cursaro C, Felline F, Loggi E, Derrico A, et al. Thymosin-alpha 1 plus interferon-alpha for anive patients with chronic hepatitis C: results of a randomized controlled pilot trial. *J Viral Hepatol*. 2004;11:69-73.
- Brillanti S, Levantesi F, Masi L, Foli M, Bolondi L. Triple antiviral therapy as a new option for patients with interferon nonresponsive chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2000;32:630-4.
- Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, López-Díaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, et al. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol*. 2002;76:5062-70.
- Davis R, Millar C, Nikolic N, et al. FACS-based assays to detect antigen-specific T cells in healthy volunteers administered HCV core ISCOMATRIX® vaccine. 33rd annual scientific Meeting of the Australasian Society of Immunology (ASI); Perth 2003 dec 7-11.
- Manns MP, Berg, Wedemeyer H, Hinrichsen H. Immunization with the therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine IC41 in 66 chronic hepatitis C non responder patients [resumen 195]. *Actas del 55 Annual*

- Meeting of American Association for the Study of Liver Disease; 2004, octubre 29-noviembre 2; Boston. Boston: American Association for the Study of Liver Disease; 2004.
38. Nevens F, Roskams T, Van Vlierberghe H, Horsmans Y, Sprengers D, Elewaut A, et al. A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38:1289-96.
 39. Arribillaga L, De Cerio AL, Sarobe P, Casares N, Gorraiz M, Vales A, et al. Vaccination with an adenoviral vector encoding hepatitis C virus (HCV) NS3 protein protects against infection with HCV-recombinant vaccinia virus. *Vaccine*. 2002;21:202-10.
 40. Arribillaga L, Sarobe P, Arina A, Gorraiz M, Borrás-Cuesta F, Ruiz J, et al. Enhancement of CD4 and CD8 immunity by anti-CD137 (4-1BB) monoclonal antibodies during hepatitis C vaccination with recombinant adenovirus. *Vaccine*. 2005;23:3493-9.
 41. Bhopale GM, Nanda RK. Emerging drugs for chronic hepatitis C. *Hepatology Research*. 2005;32:146-53.
 42. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*. 2003;426:186-9.
 43. Afdhal N, Godofsky E, Rustgi V, McEniry D, Zhou XJ. Final phase I/II trials results for NM283, a new polymerase inhibitor for hepatitis C. Antiviral efficacy and tolerance in patients with HCV 1 infection, including previous interferon failures. Disponible en: http://www.idenix.com/products/datafiles_nm283/AfdhalAASLD04_10-04.pdf
 44. Dugourd D, Fenn J, Siu R, Coulson R, Clement JJ. Synergistic inhibition of flaviviridae virus by celgosivir in combination with ribavirin or IFN-alpha. Disponible en: http://www.migenix.com/annuals/ICAR-2005_1.pdf
 45. Dugourd D, Fenn J, Siu R, Coulson R, Clement JJ. *In vitro* characterization of celgosivir, a clinical stage compound for the treatment of HCV infections. Disponible en: http://www.migenix.com/annuals/ICAR-2005_1.pdf
 46. Standring DN. NM 283 has potent antiviral activity against chronic hepatitis C virus, genotype 1, in chimpanzee. Disponible en: http://www.idenix.com/products/datafiles_nm283/StandringqEASL2004_7-03.pdf
 47. Wang L, Hernández-Alcoceba R, Shankar V, Zabala M, Kochanek S, Sangro B, et al. Prolonged and inducible transgene expression in the liver using gutless adenovirus: a potential therapy for liver cancer. *Gastroenterology*. 2004;126:278-89.
 48. Fiedler M, Rodicker F, Salucci V, Lu M, Aurisicchio L, Dahmen U, et al. Helper-dependent adenoviral vector-mediated delivery of woodchuck-specific genes for alpha interferon (IFN-alpha) and IFN-gamma: IFN-alpha but not IFN-gamma reduces woodchuck hepatitis virus replication in chronic infection *in vivo*. *J Virol*. 2004;78:10111-21.
 49. Berraondo P, Ochoa L, Crettaz J, Rotellar F, Vales A, Martínez-Anso E, et al. IFN-alpha gene therapy for woodchuck hepatitis with adeno-associated virus: differences in duration of gene expression and antiviral activity using intraportal or intramuscular routes. *Mol Ther*. 2005;12:68-76.
 50. García-Navarro R, Blanco-Urgoiti B, Berraondo P, Sánchez de la Rosa R, Vales A, Hervas-Stubbs S, et al. Protection against woodchuck hepatitis virus (WHV) infection by gene gun coimmunization with WHV core and interleukin-12. *J Virol*. 2001;75:9068-76.
 51. Borgia G. HepeX-C (XTL biopharmaceuticals). *Curr Opin Investig Drugs*. 2004;5:892-7.
 52. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol*. 1998;93:139-43.