

Les nouvelles molécules anti-VHC :

Quand seront-elles disponibles et comment ?

Docteur Marc BOURLIERE

Service d'Hépatologie-Gastro-Entérologie Hôpital Saint Joseph
26 bd de Louvain 13008 Marseille
email : mbourliere@hopital-saint-joseph.fr

Depuis deux décennies, de nombreux progrès ont été réalisés dans le traitement de l'hépatite C. La réponse virologique soutenue témoin de la guérison de l'hépatite C est passée de 8 à 12% dans le début des années 90 sous interféron seul, à plus de 50% aujourd'hui sous interféron pégylé et ribavirine. Ces progrès thérapeutiques sont liés, d'une part à une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'interféron et de la ribavirine et d'autre part à une meilleure utilisation de ces molécules liée notamment à une meilleure connaissance des facteurs prédictifs de réponse (génotype, charge virale, fibrose, poids...), à une meilleure utilisation des outils virologiques dans la prise en charge thérapeutique, à une meilleure gestion des effets secondaires des traitements et enfin à une prise en charge plus active des populations les plus difficiles à traiter (patients cirrhotiques, coinfection VIH-VHC, patients transplantés...).

Les futurs et nouveaux traitements de l'hépatite C appartiennent à quatre grandes catégories que sont les nouveaux interférons, les alternatives à la ribavirine, les inhibiteurs spécifiques du VHC et les traitements immunomodulateurs.

1) les nouveaux interférons :

De nouveaux interférons sont actuellement en cours de développement. L'objectif est de disposer d'interféron ayant une meilleure efficacité antivirale et immunomodulatrice ainsi que de meilleurs profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques avec si possible moins d'effets secondaires. De nombreux efforts sont réalisés pour essayer d'optimiser l'administration de l'interféron alpha, avec l'utilisation de pompe pour l'infusion lente et prolongée, l'encapsulation dans des liposomes ou l'utilisation de polymères de nano particules comme l'interféron -alpha XL (Flamel Technologies) utilisant le système Medusa qui permet d'obtenir avec une administration hebdomadaire une meilleure efficacité antivirale que l'interféron standard dans une étude de phase I (1) et une efficacité identique mais une meilleure tolérance que l'interféron pégylé. La conjugaison avec l'albumine est actuellement la technique la plus avancée. L'albinterféron (Human Genome Sciences) administrée de façon bimensuelle en association avec la ribavirine permet d'obtenir une diminution plus rapide et plus intense de la virémie par rapport à la bithérapie standard dans les études de phases IIb avec une meilleure qualité de vie (2) (3, 4). La réponse virologique soutenue est comparable à celle de la bithérapie pégylée dans les études de phase II avec cependant une meilleure réponse chez les patients de plus de 75 kg (5). Les études de phase III sont en cours avec cependant des problèmes de tolérance aux fortes doses. L'interféron consensus (Alfacon-1 , Infergen, Amgen et InterMune/Yamamouchi) est plus efficace que les interférons alpha 2 mais son administration quotidienne est un facteur limitant son utilisation (6). De nouveaux interférons issus d'un mélange de gènes (gene shuffled interféron alpha) sont prometteurs. Ils présentent in vitro une activité antivirale dix fois plus importante que l'interféron alpha ou consensus (7). Enfin, il ne semble pas évident à ce jour, que l'interféron gamma ou omega puissent être plus efficaces dans le traitement de l'hépatite C seul ou en association avec l'interféron alpha (8). Une dernière approche consiste à utiliser des inducteurs oraux de l'interféron. L'isotoribine (Anadys pharmaceuticals) est un analogue

nucléosidique qui est un agoniste des récepteurs Toll like 7 qui induisent le système interféron. Il a été récemment montré qu'il entraîne une réduction modeste de la charge virale (9). Une pro-drogue orale de cet agoniste est actuellement en cours d'étude (10). Le CPG10101 est un agoniste des récepteurs Toll-like 9 qui a démontré sa capacité à induire plusieurs réponses immunes. Dans une étude de phase I/II, le CPG 10101 associé à l'interféron pégylé induit une réponse virologique précoce identique à celle induite par la bithérapie classique et la triple association CPG 10101, interféron pégylé et ribavirine semble induire une réduction plus importante de la charge virale après 12 semaines de traitement (11). L'avenir de ces inducteurs oraux de l'interféron reste cependant à préciser.

2) les alternatives à la ribavirine.

La ribavirine est un analogue de la guanosine qui en association avec l'interféron augmente la réponse virologique prolongée. La ribavirine, *in vitro*, a un effet modéré, transitoire dose-dépendant sur la réplication virale. Elle inhibe de façon modérée l'ARN polymérase du VHC. Son principal effet est d'inhiber l'IMPDH, une enzyme impliquée dans la synthèse des GTP et de l'ARN polymérase du VHC. Par ailleurs, elle pourrait induire indirectement des mutations à cause de son incorporation dans le génome viral ; enfin, elle pourrait favoriser la réponse immunitaire Th1. De plus les modèles mathématiques sur la réplication du virus suggèrent que la ribavirine en association avec l'interféron pourrait agir en rendant le VHC moins infectieux. Cependant les mécanismes d'action de la ribavirine restent en grande partie méconnus et sa toxicité hématologique demeure problématique. Les alternatives à la ribavirine sont actuellement décevantes. La lévovirine, un isomère levogyre de la ribavirine, a vu son développement stoppé du fait d'une moindre efficacité. La viramidine, (Taribavirine) une pro-drogue de la ribavirine est actuellement en phase III avec des résultats décevant sur la plan antiviral à la dose fixe utilisée dans ces deux études mais avec une moindre toxicité hématologique comme cela était attendu (12). Une étude de phase II montre que des doses plus importantes que celles

actuellement utilisées (25m/Kg) montre une efficacité plus importante avec toujours un bénéfice en terme de réduction du risque d'anémie (13). Deux inhibiteurs oraux de l'IMPDH, le mérimépopid (VX-497) et le mycophénolate mofétil (qui a aussi une action immunomodulatrice) ont pour l'instant donné des résultats décevants dans les études de phase I et II, bien que le mérimépopid augmente l'activité antivirale de la bithérapie pégylée (14). Le développement de ces molécules est pour l'instant arrêté et il n'est pas encore démontré avec certitude que les inhibiteurs de l'IMPDH joueront un rôle important dans les futurs traitements du VHC.

3) Les inhibiteurs spécifiques du VHC

La détermination récente de la structure cristalline tridimensionnelle de plusieurs protéines structurales et non structurales issues du génome du VHC et le développement de méthodes permettant in vitro de tester l'efficacité anti-virale de nouvelles molécules a permis le développement de molécules inhibitrices contre ces nouvelles cibles. Théoriquement, toutes les étapes du cycle du virus C sont des cibles potentielles pour ces nouvelles molécules. A ce jour, les principales cibles sont le site interne d'entrée ribosomale (IRES) la structure qui déclenche la translation des polyprotéines du VHC, la protéine NS3 qui possède une activité protéase et hélicase et la protéine NS5B ARN polymérase ADN dépendante qui catalyse la réplication du VHC. Les inhibiteurs du site d'entrée interne ribosomale (IRES) comprennent les oligodeoxynucléotides antisens, les ribozymes et ARN interférants. Toutes ces molécules inhibent l'IRES dans les modèles in vitro mais les résultats en clinique ont été décevants que ce soit pour l'ISIS 14803 (ISIS pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA), pour l'Heptazyme (Sirna Therapeutics, San Francisco, CA, USA) ou pour les petits ARN interférants (15) (16). La cause de ces échecs est liée au fait que ces molécules ont été conçues pour cibler la structure bidimensionnelle de l'IRES, alors que dans la cellule infectée l'IRES est présent sous une forme de complexe tridimensionnel. De nouvelles approches ciblant cette structure

tridimensionnelle de l'IRES sont actuellement à un stade de développement pré clinique(17).

Plusieurs classes d'inhibiteurs de protéase NS3 ont pu être développées après la découverte de la structure tridimensionnelle de la protéase NS3 associée à son cofacteur NS4. Ces inhibiteurs ont tous démontré leurs activité in vitro. Actuellement, plusieurs molécules ont connu un développement clinique avec une diminution rapide (2 à 4 log) de la charge virale(18) (19) (20). La BILN 2061 (Boehringer-Ingelheim) a arrêté son développement en phase I du fait d'une toxicité myocardique chez le singe. La VX 950 (Télaprévir) (Vertex pharmaceuticals) et la SCH 503034 (Bocéprévir) (Schering-Plough pharmaceuticals) sont actuellement en phase III. Le TMC 435350 (Tibotec) et la BILN 12202 (Boehringer-Ingelheim) sont actuellement en phase II et La MK 7009 (Merck) et l'ITMN-191(InterMune et Roche) sont en phase I. Ces molécules semblent dépourvues d'effets secondaires mais leur utilisation en monothérapie est illusoire du fait de l'apparition rapide en quelques jours de résistances (21). Par contre leur association avec une bithérapie pégylée semble prometteuse. Les études de phase II montrent que le télaprévir permet d'obtenir une réponse virologique soutenue après trois mois de trithérapie et trois mois de bithérapie chez 61% vs 41% pour la bithérapie pégylée chez des patients de génotype 1 dans l'étude Prove1 et chez 68% vs 46% dans l'étude Prove2 conduite en Europe (22, 23). L'étude de phase II montre que le bocéprévir à la dose 800 mgx3/j en association avec la bithérapie pégylée pendant 24 semaines permet d'obtenir une réponse virologique prolongée chez 57% des patients (24).

Plusieurs analogues nucléosidiques inhibiteurs de l'ARN polymérase ADN dépendante ont été récemment développés La Valopicitabine (NM283 , Idenix pharmaceuticals) est un analogue nucléosidique qui cible les sites catalytiques de la polymérase. Dans les études de phase I et II, cette molécule induit une diminution modérée mais soutenue de la charge virale. Son effet semble additif à celui de l'interféron chez des patients de génotype 1, mais sa tolérance est médiocre sur le plan digestif et son développement a été arrêté (25)

(26). Le R 1626 ou RO4588161 (Roche) est une prodrogue d'un analogue nucléosidique qui est un inhibiteur puissant de la réplication virale in vitro. Les études de phase I montrent une réduction rapide et modérée de la charge virale avec une bonne tolérance (27). L'étude de phase II en association avec la bithérapie pégylée pendant un mois suivie d'une bithérapie pégylée pendant 44 semaines montre une réponse virologique soutenue chez 82% vs 66% pour la bithérapie pégylée chez des patients de génotype 1 (28). Cependant la tolérance hématologique est médiocre en terme de leucopénie. D'autres inhibiteurs de l'ARN polymérase tel que le MK-0608 (Merck) ou le R 7128 (Pharmasset et Roche) sont actuellement en phase I ou II avec des résultats encourageants (28).

Une autre approche est l'utilisation des inhibiteurs de la cyclophiline. Les cyclophilines sont des ligands cytoplasmiques de la ciclosporine qui inhibent la réplication du VHC dans le système réplicon. Le DEBIO-025, un inhibiteur de la cyclophiline, a montré une activité antivirale dans les études in vitro et in vivo contre le VIH et le VHC (29). Dans une étude de phase IIa, différentes doses de Debio 025 ont été testées plus ou moins associées au PEG-IFN α -2a pendant 29 jours. Dans les bras PEG-IFN + Debio 025, 600 mg et 1 000 mg, on notait une diminution médiane de la charge virale d'environ -4,5 log UI/ml. Le pourcentage d'ARN indétectable chez les patients génotype 1/4 semblait être plus élevé dans le bras PEG + Debio 1 000 mg que dans tous les autres bras testés. Le bénéfice semblait être moindre chez les patients génotype 2/3 par rapport au bras contrôle. Aucun effet secondaire sévère n'a été observé chez les malades recevant le Debio 025. Le traitement a été arrêté en raison d'effets secondaires minimes ou modérés (dont une hyperbilirubinémie réversible dans le bras monothérapie Debio 1 000 mg). 13 hyperbilirubinémies réversibles ont été signalées dans les 2 bras comportant 1 000 mg du Debio. Cet effet est dû à une interaction sur les transporteurs des canalicules biliaires(30).

Le nitazoxanide (NTZ) est un thiazolide utilisé pour le traitement des infections à *Giardia Lamblia* et à *Cryptosporidium* spp. aux USA. Il bloque la synthèse protéique virale en inhibant la

déphosphorylation du facteur d'initiation eucaryotique 2α (elf2 α). Un effet antiviral anti-VHC et anti-VHB a été observé chez les patients VIH traités avec ce produit pour une cryptosporidie. Ce médicament potentialise l'activité de l'IFN dans le modèle réplicon. STEALTH C est une étude randomisée menée dans 2 centres égyptiens. Les malades étaient tous infectés par le génotype 4. C'est une étude comparative entre 3 schémas thérapeutiques PEG-IFN α -2a (180 μ g/sem) + ribavirine (1 000-1 200 mg/j), NTZ (500 mg 2 X/j) en monothérapie pendant 12 semaines suivi de NTZ + PEG-IFN α -2a et enfin NTZ en monothérapie pendant 12 semaines suivi de NTZ + PEG-IFN α -2a + ribavirine pour les malades naïfs. Le taux de réponse virologique soutenue était significativement supérieur ($p = 0,023$) dans le bras PEG-IFN/RBV+NTZ (79 %) par rapport au groupe contrôle (50 %) et ce malgré une durée de traitement par PEG-IFN/RBV uniquement de 36 semaines contre 48 semaines dans le groupe contrôle. Ces résultats sont encourageants car l'effet antiviral du NTZ ne semble pas limité à un seul génotype contrairement aux inhibiteurs de la protéase ou de la polymérase(31).

L'entrée virale est aussi une cible intéressante pour le développement d'antiviraux. La méconnaissance de cette étape du cycle viral a freiné l'étude de telles molécules, mais la mise au point récente de modèles de cultures cellulaires devrait améliorer notre connaissance et la mise au point de nouvelles drogues (32). Des inhibiteurs de la protéine P7 qui possèdent une activité de canal ionique et qui pourraient être impliqués dans la morphogénèse et l'entrée virale sont actuellement en évaluation pré-clinique, de même que des inhibiteurs de l'hélicase NS3.

La morphogénèse du VHC représente aussi une cible antivirale intéressante. Une nouvelle classe de molécules dérivées des sucres les sucres-iminés inhibent la sécrétion des virions et diminuent l'infectiosité des particules virales néoformées dans les modèles in vitro. L'intérêt de ces molécules est l'absence d'émergence de virus résistant in vitro. Une étude de phase IIa avec le celgosivir (Migenix) en association avec une bithérapie pégylée montre une

réponse virologique précoce à 12 semaines supérieures à la bithérapie pégylée chez des patients de génotype 1 non répondeurs (33)

Le développement de ces inhibiteurs spécifiques du VHC va rapidement se heurter à l'apparition de résistances virales comme le montre l'expérience de l'utilisation de ces molécules dans le traitement du VIH ou du VHB et l'apparition rapide de résistances virales avec le télaprévir et le bocéprévir (21) (20). Ces résistances peuvent être prévenues par une chute très rapide de la charge virale, l'association de molécules de mécanismes différents sans résistances croisées, et l'utilisation de drogues ayant une distribution tissulaire rapide et importante empêchant l'apparition de sanctuaire viraux.

4) Les traitements immunomodulateurs

Plusieurs molécules immunomodulatrices comme la thymosine alfa1, le dihydrochlorure d'histamine en association avec une bithérapie ont montré des résultats chez les patients non répondeurs (34) (35). Des Etudes de phase II en association avec une bithérapie pégylée sont en cours pour déterminer l'intérêt thérapeutique de ces molécules. Par contre, l'interleukine 10 et 12 n'ont pas démontré d'efficacité en terme virologique ou histologique. De même l'immunisation passive par des immunoglobulines spécifiques ou des anticorps monoclonaux ont montré des résultats encourageants à confirmer dans les études de phase II pour prévenir la récurrence virale chez les patients transplantés(36).

Plusieurs stratégies de vaccination sont actuellement à l'étude (37, 38). Les études pré cliniques et cliniques montrent que les vaccins thérapeutiques basés sur plusieurs formes de protéines recombinantes du VHC avec différents adjuvants peuvent réguler la réponse immunitaire cellulaire et humorale chez les patients VHC (39). Cependant, il n'y a pas de preuve que les vaccins diminuent la charge virale. Le rôle de ces vaccins en association avec les molécules antivirales reste à préciser.

Le but du traitement du VHC est la guérison de la maladie qui est obtenue actuellement chez la plupart des patients de génotype 2 ou 3

mais chez moins de la moitié des patients de génotype 1 ou 4. Les nouvelles approches thérapeutiques qui se développent notamment les inhibiteurs spécifiques du VHC et leurs associations permettant des mécanismes d'action différente évitant la survenue de résistances croisées devraient permettre dans un avenir proche d'atteindre cet objectif chez la plupart des patients au moins dans les pays riches. Les développements en cours permettent d'espérer, en l'absence d'effets délétères dans les études de phase III, une ATU voire une AMM pour les premières molécules (télaprévir et bocéprévir) à l'horizon de 2009 ou 2010.

Références :

1. Trepo C, Meyrueix R, Maynard M, et al. Novel sustained release formulation of IFN alpha-2b improves tolerability and demonstrates potent viral load reduction in phase I/II HCV clinical trial. *J Clin Virol* 2006;36 suppl 2:S24.
2. Balan V, Nelson DR, Sulkowski MS, et al. A Phase I/II study evaluating escalating doses of recombinant human albumin-interferon-alpha fusion protein in chronic hepatitis C patients who have failed previous interferon-alpha-based therapy. *Antivir Ther* 2006;11(1):35-45.
3. Zeuzem S, Benhamou Y, Shouval D, et al. Interim (week 12) phase 2b virological efficacy and safety results of albumin interferon alpha-2b combined with ribavirin in genotype 1 chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S270.
4. Rustgi V, Nelson DR, Balan V, et al. A phase 2 dose escalation study of albuferon combined with ribavirin in non responders to prior interferon-based therapy for chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S50.
5. Zeuzem S, Yoshida EM, Benhamou Y, et al. Sustained virological response rates with albinterferon alfa2bplus ribavirin treatment in IFN naive chronic hepatitis C genotype 1 patients. *Hepatology* 2007;46 (suppl 1):317A.
6. Cornberg M, Hadem J, Herrmann E, et al. Treatment with daily consensus interferon (CIFN) plus ribavirin in non-responder patients with chronic hepatitis C: a randomized open-label pilot study. *J Hepatol* 2006;44(2):291-301.
7. Brideau-Andersen A, Huang X, Chang Sun S, et al. Directed evolution of novel gene shuffled interferon alpha for the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S6.
8. Okuse C, Rinaudo JA, Farrar K, Wells F, Korba BE. Enhancement of antiviral activity against hepatitis C virus in vitro by interferon combination therapy. *Antiviral Res* 2005;65(1):23-34.

9. Horsmans Y, Berg T, Desager JP, et al. Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2005;42(3):724-31.
10. Fletcher S, Steffy K, Averett D. Masked oral prodrugs of toll like receptor 7 agonists: a new approach for the treatment of infectious disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2006;8:702_8.
11. Mc Hutchison J, Ghalib RH, Lawitz EJ, et al. Early virological response to CPG 10101 in combination with pegylated interferon and /or ribavirin in chronic HCV genotype 1 infected patients with prior relapse response. *J Hepatol* 2006;44 (suppl 2):S269.
12. Benhamou Y, Pockros P, Rodriguez-Torres M, et al. The safety and efficacy of viramidine plus pegylated interferon alfa-2b versus ribavirine plus pegylated interferon alfa-2b in therapy naïve patients infected with HCV: Phase III results. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S273 (abstract).
13. Poordad F, Lawitz E, Chun E, Hammond J. Treatment week 12 results of weight-based taribavirin versus weight-based ribavirin both with peginterferon alfa-2b in naïve chronic hepatitis C genotype 1 patients. *J Hepatol* 2008;48 (suppl 2):S373.
14. Mc Hutchison J, Shiffman ML, Cheung RC, al. E. A randomized, double blind, placebo controlled dose escalation trial of merimepodib (VX-497) and interferon alpha in previously untreated patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2005;10:635-43.
15. McHutchison JG, Patel K, Pockros P, et al. A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2006;44(1):88-96.
16. Trepanier JB, Tanner JE, Alfieri C. Oligonucleotide-based therapeutic options against hepatitis C virus infection. *Antivir Ther* 2006;11(3):273-87.
17. Wilson JA, Richardson CD. Future promise of siRNA and other nucleic acid based therapeutics for the treatment of chronic HCV. *Infect Disord Drug Targets* 2006;6(1):43-56.
18. Hinrichsen H, Benhamou Y, Wedemeyer H, et al. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease

inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* 2004;127(5):1347-55.

19. Reesink HW, Forestier N, Weegink CJ, et al. Initial results of a 14 day study of the hepatitis C virus inhibitor protease VX-950 in combination with peginterferon alpha-2A. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S272 abstract.

20. Zeuzem S, Sarrazin C, Wagner F, et al. The HCV NS3 protease inhibitor SCH 503034 in combination with PEG-IFN alfa-2b in the treatment of HCV-1 PEG-IFN alpha-2b non responders: antiviral activity and HCV variant analysis. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S35 abstract.

21. Kieffer T, Sarrazin C, Bartels D, et al. Wild type HCV NS3 protease re-emerges during follow-up after 14 days of dosing with VX-950 in patients with genotype 1 HCV. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S7 abstract.

22. McHutchison J, Everson GT, Gordon C, et al. Prove 1: Results from a phase 2 study of telaprevir with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment naive subjects with hepatitis C. *J Hepatol* 2008;48 (suppl 2):S4.

23. Dusheiko G, Hezode C, Pol S, et al. Treatment of chronic hepatitis C with telaprevir in combination with peginterferon alfa-2a with or without ribavirin: further interim analysis of the Prove 2 study. *J Hepatol* 2008;48 (suppl 2):S26.

24. Kwo P, Lawitz E, McCone J, et al. Interim results from HCV Sprint-1: RVR/EVR from phase 2 study of boceprevir plus peginterferon alfa-2b ribavirin in treatment naive subjects with genotype 1 CHC. *J Hepatol* 2008;48 (suppl 2):S372.

25. Afdhal N, O'Brien C, Godofsky E, et al. Valopicitabine (NM203) alone or with peg-interferon compared to peg-interferon / ribavirin re-treatment in hepatitis C patients with prior non response to pegIFN/RBV: week 24 results. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S19 abstract.

26. Dieterich D, Lawitz EJ, Nguyen T, et al. Early clearance of HCV RNA with valopicitabine (NM203) plus PEG-IFN in treatment naïve

patients with HCV-1 infection: First results from a phase IIb trial. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S271- S2 abstract.

27. Roberts S, Cooksley G, Shaw D, et al. Interim results of a multiple ascending dose study of R1626 a novel nucleoside analog targeting HCV polymerase in chronic HCV patients. *J Hepatol* 2006;44 suppl 2:S269 abstract.

28. Nelson D, Pockros PJ, Godofsky E, et al. High end of treatment after 4 weeks of R1626 peginterferon alfa-2a and ribavirin followed by a further 44 weeks of peginterferon alfa-2a and ribavirin. *J Hepatol* 2008;48 (suppl 2):S371.

29. Flisiak R, Horban A, Gallay P, et al. The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 2008;47(3):817-26.

30. Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, et al. Efficacy and safety of increasing doses of the cyclophilin inhibitor Debio 025 in combination with pegylated interferon alfa-2a in treatment naive chronic HCV patients. *J Hepatol* 2008;48 (Suppl 2):S62.

31. Rossignol JF, Elfert A, El-Gohary Y, Keeffe EB. Randomized controlled trial of nitazoxanide-Peginterferon -ribavirin, nitazoxanide-Peginterferon and peginterferon-ribavirin in the treatment of patients with chronic hepatitis C genotype 4. *J Hepatol* 2008;48 (suppl 2):S30.

32. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11(7):791-6.

33. Kaita KD, Yoshida EM, Kunimoto DA, F., et al. Phase II proof of concept study of cegosivir in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in chronic hepatitis C genotype 1 non responders patients. *J Hepatol* 2007;46 (suppl 1):S56.

34. Poo JL, Sanchez-Avila F, Kershenovich D, Garcia-Samper X, Gongora J, Uribe M. Triple combination of thymalfasin, peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior interferon and ribavirin treatment: 24-week

interim results of a pilot study. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19(12):S79-81.

35. Lurie Y, Nevens F, Aprosina ZG, et al. A multicentre, randomized study to evaluate the safety and efficacy of histamine dihydrochloride and interferon-alpha-2b for the treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2002;9(5):346-53.

36. Eren R, Landstein D, Terkieltaub D, et al. Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *J Virol* 2006;80(6):2654-64.

37. Puig M, Major ME, Mihalik K, Feinstone SM. Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine* 2004;22(8):991-1000.

38. Folgori A, Capone S, Ruggeri L, et al. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 2006;12(2):190-7.

39. Sugauchi F, Wang RY, Qiu Q, Jin B, Alter HJ, Shih JW. Vigorous hepatitis C virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses induced by protein immunization in the presence of Montanide ISA720 plus synthetic oligodeoxynucleotides containing immunostimulatory cytosine-guanine dinucleotide motifs. *J Infect Dis* 2006;193(4):563-72.