نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۳۸، بهـار ۱۴۰۰
ص‌ص: ۸۳~۹۰

مقایسه نانوبادی با ریباورین و پگ اینترفرون بمنظورمهار اتصال ویروس *هپاتیت C*

فریبا قربان زاده[۱]، جلیل توکل افشاری[۲]، سعید زیبائی*[۳]، زهرا مشکات[۴]، مژگان محمدی[۵]
دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی مشهد ، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
استاد دانشگاه علوم پزشکی مشهد ، دانشکده پزشکی ،گروه ایمونولوژی،
دانشیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق ، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی
دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد ، دانشکده پزشکی، گروه ویروس شناسی
دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۳۵۹۱۹
Email: S.zibaee@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2021.124295

چکیده:

ویروس هپاتیت C ابیماری بسیار مهمی است که سلامت جامعه جهانی را تهدید می کند.*HCV* فاقد واکسن موثر می باشد.درمان هپاتیت C شامل tPeyglated Inerferon وRibaviring بوده که با عوارض زیادی همراه می باشد.نانوبادی هافاقد زنجیره سبک بوده و دارای خصوصیات منحصر به فرد و اندازه کوچک هستند که سبب تمایز آنها و استفاده آنها برای درمان شده است.

در این تحقیق پس از خون گیری جدا سازی سرم و تایید نانوبادی با استفاده از تکثیر ویروس در رده سلولی هپاتوسولار کارسینومای انسانی Huh7.5 با استفاده از Real time PCR مهار اتصال ویروس *هپاتیت C* توسط نانوبادی با ریباورین و پگ اینترفرون مقایسه شد.

نتایج نشان داد که نانوبادی ، احتمالا به دلیل مهار گیرنده های سطح سلول که برای اتصال ویروس مورد نیاز است ، مانع اتصال وسبب مهار تکثیر ویروس *هپاتیت C* می گردد.

Applied Animal Science Research Journal No 38 pp: 83-90

Comparison of Nanobody with Ribavirin and Peg Interferon to inhibit of binding Hepatitis C virus

By: Ghorbanzadeh, F[1]. Tavakkol-Afshar, J[2]. Zibaee, S[3]. Meshkat, Z[4]. Mohammadi, M[5]
1-MSc graduate student Mashhad University of Medical Sciences. School of Medicine. Department of Immunology
2- Professor. Mashhad University of Medical Sciences. School of Medicine. Department of Immunology
3- Associate professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Mashhad
4- Associate Professor. Mashhad University of Medical Sciences. School of Medicine. Department of Virology
5- Associate Professor. Mashhad University of Medical Sciences. School of Medicine. Department of Immunology

Received: December 2020 **Accepted: April 2021**

The *hepatitis C virus* is a very important disease that threatens the health of the international community. *HCV* lacks an effective vaccine. The treatment of *hepatitis C* includes Peyglated Interferon and Ribavirin, which are associated with many side effects. Nanoparticles lack light chain and have unique properties and small size that differentiate them and use them for treatment. In this study, after blood sampling, serum isolation and confirmation of nanobodies using virus replication in human hepatocellular carcinoma cell line Huh7.5 using real time PCR, inhibition of *hepatitis C virus* binding by nanobody was compared with ribavirin and peg interferon. The results showed that nanobodies inhibit hepatitis C virus replication, possibly by inhibiting cell surface receptors required for virus binding.

۱-مقدمه :عفونت ناشی از ویروس *هپاتیت C* از جمله بیماری های بسیار مهمی می باشد که سلامت جامعه جهانی را تهدید می کند. تخمین زده میشود ۱۷۰ میلیون نفر در دنیا مبتلا به این بیماری می باشند. بیش از ۳۰ درصد مبتلایان به این بیماری، جان خود را در اثر عفونت های ناشی از این بیماری از دست می دهند. عفونت حاد در ۱۵ الی ۲۵٪ موارد با علائم کلینیکی (زردی) همراه است و در۷۰ الی ۸۵٪ موارد به فرم مزمن و سرانجام تعدادی ازآن ها مبتلا به فیبروزکبد، سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار کبدی می شوند(۹۰). این مشکلات بسته به مدت آلودگی و میزان ویروس باعث نارسایی های کبدی می شود. در سال های اخیر عوامل مختلفی در درمان و کاهش عوارض این بیماری پیدا شده است. درمان استاندارد هپاتیت C شامل Peyglated Interferon و Ribavirin است که با عوارض زیادی از قبیل: آنمی، نوتروپنی، ترومبوسیتوپنی و علائمی نظیر شبه آنفلوآنزا، تیروئیدی، عصبی– روانی و چشمی همراه می باشد(۶۴). از جمله عواملی که در سال های اخیر در درمان بیماری های مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است، استفاده از عناصر طبیعی موجود در مواد غذایی و استفاده از محصولات و فرآورده های حیوانی طبیعی می باشد. یکی از موارد بسیار مفید ذکر شده در متون طب سنتی، استفاده از محصولات طبیعی حیوانی مثل شتر است. ایمنوگلوبین های موجود در شتر، به علت تفاوت های ساختاری و اندازه ای که با سایر ایمونوگلوبین ها دارند به نانوبادی ها معروف هستند. آنتی بادی ها در ساختار خود دو زنجیره سبک یکسان و دو زنجیره سنگین یکسان دارند که با پیوند های دی سولفیدی بین زنجیره بهم متصل هستند (۱،۲). نانوبادی ها (آنتی بادی های تک دومینی) (HCAbs) فاقد زنجیره سبک بوده و دارای خصوصیات منحصر به فرد و اندازه کوچک هستند که سبب تمایز آنها و استفاده آنها برای درمان شده است. در زنجیره سنگین نانو بادی اسید آمینه

های آب دوست جایگزین اسید آمینه های آب گریز شده که این امر باعث انعطاف پذیر شدن حلقه های اتصال به آنتی ژن ن،فوذ زیادتر، و واکنش بیشتری نسبت به آنتی ژن ها می گردد. از ویژگی های دیگر این آنتی بادی ها پایداری دربرابر تغییرات PH ومقاومت در برابر حرارت می باشد (۱) .

در مطالعات اخیر این آنتی بادی ها درایمونو تراپی برای درمان سرطان، بیماریهای التهابی و عفونی و خنثی سازی عوامل بیماری زا مورد توجه قرار گرفته است. خصوصیات منحصر به فرد نانوبادی ها منجر به ایجاد برتریهایی نسبت به آنتی بادیهای درمانی متداول شده است. با توجه به نقش مهم درمانی فرآورده های شتر در بسیاری از بیماری ها و مشکلات موجود در درمان بیماران مبتلا به *هپاتیت C*، هدف از این مطالعه با هدف مقایسه نانوبادی برمهار رشد اتصال *ویروس هپاتیت C (HCV)* با ریباورین و پگ اینترفرون به صورت in vitro در کشت سلولی می باشد.

۲- مواد و روشها:

۲-۱-مواد:

Trypan blue DMSO و سولفات آمونیوم و Trypsin (EDTA) از شرکت *Merck* -کیسه دیالیز از *بیوژن* DMEM از *Caisson*- PBS و Penicillin G – Streptomycin و Fetal Bovine Serum (FBS) از شرکت *Gibco* - Ribavirin از شرکت *Minapharm* - pegylated interferon alfa-2a از شرکت *Merck Sharp & Dohme* -کیت استخراج RNA از شرکت تکاپو زیست کیت *HCV Real time- PCR* از شرکت آمیتیس ژن

۲-۲-روشها:

پس از خون گیری از شترها سرم آنها را جدا کرده و جهت انجام آزمایشات در دمای ۲۰C°- ذخیره گردید.

برای جداسازی نانوبادی از محلول سولفات آمونیوم اشباع وسپس دیالیز استفاده شد.

۲-۲-۱-اثبات وجودنانوبادی :

جهت تشخیص و اثبات وجود نانوبادی از الکتروفورز SDS-PAGE (از ژل آکریل آمایدد۱۲/۵ درصد) استفاده گردید.

۲-۲-۲- کشت سلول:

۲-۲-۲-۱-تکثیر ویروس هپاتیت C در رده سلولی هپاتوسولار کارسینومای انسانی Huh7.5:

برای تکثیر ازسلول های (Huh7.5) استفاده شد. در این رده چون مسیر RIG-1 مهار گردیده، برای *HCV* به رده سلولی مجاز تبدیل شده است.سلول ها از تانک ازت خارج و کشت و درصد سلول های زنده با رنگ آمیزی ت تریپتان بلو تعیین شد. برای تکثیر محیط کشت داخل فلاسک خارج و پس ازشستشو با PBS ، محلول حاوی ویروس به همراه ۰/۵ میلی لیتر از محیط کشت را به فلاسک اضافه و پس از۲ ساعت محیط کشت DMEM به آن اضافه گردید بعد از ۴۸ ساعت مایع رویی جمع آوری و بار دیگر کشت ویروس تکرار و بعد از آن محلول جمع آوری شده برای بررسی تیتر ویروس برداشته شد .

۲-۲-۲-۲ مجاورت ویروس HCV با نانوبادی در کشت سلول :

ابتدا دو میکروتیوب در نظر گرفته می شود.در تیوب اول(۱۵۰میکرولیتر ویروس) وتیوب دوم (نمونه آزمایشی) مقدار ۱۵۰ میکرولیتر ازنانوبادی (با غلظت ۱۸/۵ mg/ml) و ۱۵۰ میکرولیتر ویروس اضافه گردید. هر دو تیوب به مدت ۱/۵ ساعت در۴ درجه سانتیگراد انکوبه وسپس به چاهک های کشت سلولی اضافه شدند. در چاهک های دیگر ، ۱۵۰ میکرولیتر از دارو های ریباورین و پگ اینترفرون اضافه گردید. پلیت سه بار با PBS شستشو داده ،سپس به پلیت حاوی کشت سلول مقدار ۱۰۰ میکرولیتراز تیوپ ۱ به چاهک داروها و نیز چاهک های واجد نانوبادی ۱۰۰ میکرولیتر از تیوپ ۲ تلقیح گردید و مقدار ۱۵۰ میکرولیتر میحط کشت به همه ی چاهک ها اضافه وبعد از ۴۸ ساعت مایع رویی جمع آوری و تست ریل تایم انجام گرفت.

۲-۲-۳- تیتر ویروس

۲-۲-۳-۱- استخراج RNA ویروس:

استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت DNA/RNA انجام شد.

۲-۲-۳-۲-Real time PCR:

کیت مورد استفاده در این طرح امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتر ویروس *هپاتیت C* را به روش One-Step Real- Time RT-PCR فراهم می کند. این کیت برای استفاده با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است. همچنین حاوی کنترل داخلی بوده که از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری می نماید.

در این روش تجمع قطعات تکثیر شده در هر چرخه توسط یک رنگ گزارشگر فلورسنس اندازه گیری می شود .

۲-۲-۳-۲-محاسبه تیتر ویروس:

هر کیت حاوی ۴ استاندارد کمی با غلظت مشخص می باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه مورد نظر معین می شود. استاندارد های کیت به صورت واحد در میکرولیتر IU/µl مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت واحد در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده می شود:

$$Result\left(\frac{IU}{ml}\right) = \frac{result\left(\frac{IU}{ml}\right) \times elution\ volume\ (\mu l)}{sampel\ volume\ (ml)}$$

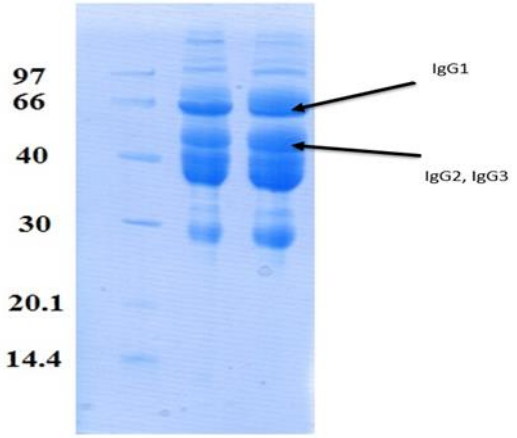
۲-۲-٤-تجزیه و تحلیل آماری:

در این مطالعه از هر آزمایش سه بار تکرار انجان شده و پس از جمع آوری داده های خام، با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا چگونگی توزیع داده ها با استفاده از تست آماری SPSS بررسی شد. برای آنالیز داده ها از آزمون آماری غیر پارامتریک استفاده شد. مقدار P value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنا داری در نظر گرفته شد.

۳-نتایج:

۳-۱-نتایج حاصل از اثبات وجودنانوبادی :

منابع می گویند که اندازه ایمونوگلوبولین G2 وG3 تقریبا برابر و ۴۲ کیلو دالتون است در حالی که ایمونوگلوبولین G1 بزرگتر و تقریبا ۶۵ کیلو دالتون می باشد نتایج نشان داد که اندازه این آنتی بادی ها بین ۴۰ تا ۶۰ کیلو دالتون است(تصویر۳-۱) باند های دیگر مربوط به سایر پروتئین های است که در هنگام استفاده از سولفات آمونیوم رسوب کرده باشند.

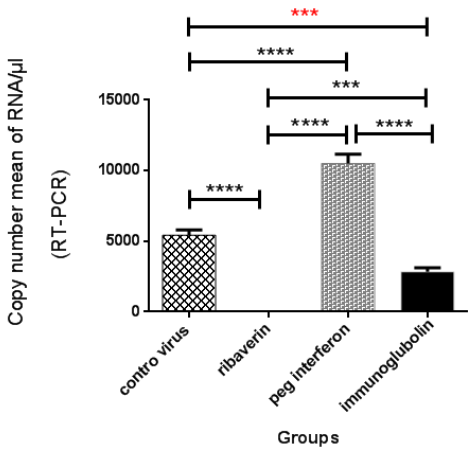


تصویر (۳-۱) : الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین سرم شتر.اندازه ایمونوگلوبولین G2 و G3

تقریبا ۴۲ کیلو دالتون و اندازه ایمونوگلوبولین G1 تقریبا ۶۵ کیلو دالتون است.

۳-۲- نتایج حاصل از Real Time PCR روند اتصال ویروس هپاتیت C به سلول Huh7.5:

نتایج نشان داد که بیشترین بار ویروسی در روند اتصال مربوط به گروه پگ اینترفرون با میانگین (10500±661.4) در مقایسه با گروه کنترل ویروسی با میانگین (5417±381.9) بوده که از لحاظ آماری معنادار بوده است ($p<0.0001$). و کمترین میزان بار ویروسی در روند اتصال مربوط به گروه ریباورین با میانگین (0±0)در مقایسه با کنترل ویروس با میانگین (5417±381.9) بوده که از لحاظ آماری معنادار بود($p<0.0001$). میانگین بار ویروسی گروه نانوبادی (متغیر اصلی) با میانگین (± 2833 288.7) در مقایسه با کنترل ویروس با میانگین (5417±381.9) بوده که از لحاظ آماری معنادار بود($p<0.001$). همان طور که نتایج نشان می دهند در این روند ریباورین و ایمونوگلوبولین به ترتیب بیشترین اثر را بر مهار اتصال ویروس *هپاتیت C* به سلول را داشتند و نسبت به یکدیگر از لحاظ آماری معنا دار بوده ($p<0.001$) اما پگ اینترفرون قادر به تاثیرگذاری نبوده است. نمودار (۳-۲)



نمودار (۳-۲): نتایج Real Time PCR روند اتصال تکثیر ویروس *هپاتیت C*

گروه ریباورین وایمونوگلوبولین قادربه مهار اتصال ویروس به سلول Huh7.5 بودند.

پگ اینترفرون در مهار روند اتصال ویروس فاقد اثر بوده است.

۳-بحث:

بیماری های مزمن کبدی نهمین عامل مرگ میر می باشد. در ۸۰درصد از افرادی که مبتلا به هپاتوسیت کارسینوما هستند، *HCV*-RNA یافت شده است که نشان میدهد *HCV* سهم عمده‌ای در این بیماری دارد. طبق آمار سال ۲۰۱۰ در ایران ۰/۹ درصد آلوده به ویروس هپاتیت C وجود دارد (۱).

HCV فاقد واکسن موثر می باشد.درمان *هپاتیت C* شامل Peyglated Interferon وRibavirin بوده که با عوارض زیادی همراه می باشد، میزان پاسخ دهی اندک به درمان وتحمیل هزینه های سنگین یکی دیگر از مشکلات این بیماری است.(۶۴) بنابراین داروها و روشهای درمانی جدید مورد نیاز است.

نتایج تحقیق نشان می دهد که آنتی بادی استخراج شده از سرم شتر(نانوبادی) دارای اثرات ضد ویروسی علیه *HCV* می باشد. طبق مشاهدات، این آنتی بادی توانایی مهار تکثیر ویروس احتمالا از طریق مهار پروتئین ها و گیرنده های سطح سلول که برای اتصال ویروس به سلول ضروری هستند، را دارد.

نانوباد یها به جهت خواص منحصر به فرد، کاربرد بسیار گسترده ای دارند. آنتی بادیهای پلی کلونال و مونوکلونال دارای مصارف تحقیقاتی، تشخیصی و درمانی بسیاری هستند ولی به علت واکنش ناحیه Fc با رسپتورهای Fc سلولهای بیگانه خوار، دارای اثرات جانبی ناخواسته می باشند.نانوبادی به علت ساختار منحصر منجربه ایجاد برتریهایی نسبت به آنتی بادیهای درمانی متداول شده است. به همین علت، در مطالعات اخیر این آنتی بادی ها در ایمونو تراپی برای درمان سرطان، بیماریهای التهابی و عفونی و خنثی سازی عوامل بیماری زا مورد توجه قرار گرفته است (۷) .

درمطالعه فخارانی در مصر (۲۰۰۸) اثرات پلی کولونال آنتی بادی شیر شتر برروی سلول های کبدی(Huh7.5) هپاتوما در محیط کشت سلولی آلوده شده به ویروس *هپاتیت C* به اثرات مهاری رشد وتخریبی پپتیدهای سنتزشده ویروسی اشاره دارد واعلام کرده ایمنوگلوبولین انسانی (IgG) وکازئین تأثیری نداشته است (۸) .

شیر شتر برای درمان عفونت های ویروسی ازجمله *هپاتیت C* و *B* و سایر ویروس ها به کار رفته است (۴) .

در یک مطالعه بالینی در سال ۲۰۱۴ در پاکستان اثرات کبدی شیر شتر در بیماران *هپاتیت C* بررسی شد. در این مطالعه شیر شتر به میزان ۵۰۰ سی سی در دو وعده به مدت دو ماه ونیم به افراد داده شد ونمونهٔ خون در فاصله هر پانزده روز گرفته و آزمایش شد. نتایج مؤثر بودن شیر در کاهش آنزیمهای کبدی (ALT, AST , ALP) و در این بیماران سطح آلبومین، پلاکت، لنفوسایت وگلوبولین را بهبود بخشیده و در کاهش سدیمانتاسیون خون (ESR) مؤثر بوده است (۶) .

مطالعات انسانی انجا م شده برروی ۴۴ بیمار هپاتیت مزمن به دنبال مصرف شیر شتر با مقایسه ۶۰ بیمار در گروه کنترل کاهش آنزیم ALTو *HbsAg* منفی را نشان داده و در 54 درصد موارد *HBV-DNA* منفی گزارش شده است. مصرف شیر شتر در بیماران مبتلا به *هپاتیت* به نظر میرسد که سبب تقویت سیستم ایمنی سلولی و بالا رفتن سطح سرمی اینترفرون گاما و برخی از سیتوکین های دیگر شده و مانع تکثیرویروس می شود (۹) .

در یک مطالعه بالینی در سال ۲۰۱۴ در پاکستان اثرات کبدی شیر

شتر در بیماران *هپاتیت C* بررسی شد . نتایج مؤثر بودن شیر در کاهش آنزیمهای (ALT, AST , ALP) کبدی را نشان داد و در این بیماران سطح آلبومین، پلاکت، لنفوسایت وگلوبولین را بهبود بخشیده و درکاهش سدیمانتاسیون خون مؤثر بوده است(۶) Hosiniو همکاران (۲۰۱۷) اثر شیر شتر بر روی ویروس *هپاتیت C* را بسیار خوب ارزیابی کردند (۴).

محققین از آنتی بادیهای شتر که از آنتی بادی انسان کوچکتر هستند و تولید آنها آسان و مقرون به صرفه است استفاده می کنند. نخستین نتایج استفاده از این آنتی بادی ها به صورت مستقیم علیه تومور در موش، نشان داد که مارکرهای پروتئینی سطح غشای تومور به صورت موفقیت آمیزی به وسیله این نانو بادی ها مورد هدف قرار گرفته است (۵) .

مطالعات ثابت کرده اند که میتوان با مهندسی ژنتیک، نانوبادی ها را به اشکال چند ظرفیتی درآورد. این ساختارها مزایای زیادی دارند از جمله بهبود در میزان اتصال به آنتی ژن با افزایش میزان ده برابر، افزایش اختصاصیت و یا اتصال همزمان به دو آنتی ژن (۱۲) .

در مطالعه ای که توسط اسماعیل و همکاران(۲۰۱۲) در مورد اترات ضد ویروسی آنتی بادی های پلی کلونال شتر علیه ویروس *هپاتیت C* در کشت سلولی HUH7.5 وPBMCs می باشد، نشان داده شده است که IgGs شتر به طور مستقیم از طریق مهار ورود ویروس هپاتیتC به درون سلول ها عمل می کند (۳) .

در مطالعه ای که توسط ریوزوک سوزاکی(۲۰۱۶)، بر روی اینترابادی های تک دومین علیه هسته ویروس *هپاتیت C* صورت گرفته است، نشان می دهد که اینترابادی ها (2H9-L and AA10) قادر به مهار تکثیر ویروس *هپاتیت C* هستند به این صورت که مراحل اسمبلی ذرات ویروسی ساخته شده درون سلول Huh7.5.1 را مانند مرحله اتصال هسته با RNA، دایمریزاسیون هسته مهارمی کند. همچنین این اینترابادی ها در مسیر سیگنالینگ NFk B اختلال ایجاد می کنند(۱۱).

طی مطالعه ای که توسط الین بونز(۲۰۱۴)، بر روی اینترابادی های تک دومین لاما (Nb190) برعلیه ویروس *HIV* صورت گرفته است، نشان می دهد که این اینترابادی ها فرایند Nultimerization پروتئین Rev در این ویروس را مهار می کند و به این صورت است که باعث سرکوب تولید و تکثیر ویروس HIV می شود(۱۳).

مطالعات نشان داده است که نانوبادیها در اثر مهار پروتئین ها و رسپتور هایی که در سطح سلول و ویروس وجود دارند و برای ورود و اتصال ویروس به درون سلول نیاز است، باعث خنثی سازی و جلوگیری از گسترش ویروس *هپاتیت C* می شوند. همچنین به دلیل دارا بودن ویژگی اینترابادی، این ایمونوگلوبولین ها برای درمان بیماری‌هایی که از دسترس داروها خارج هستند، مفید خواهد بود. در مطالعات انجام گرفته بر روی قطعات اینترابادیی که از نانوبادی ها ساخته شده اند نشان داده می شود که به واسطه این ایمونوگلوبولین می توانند، درون سلول با مهار کردن فرایندهای مربوط به تکثیر ژنوم و همچنین مراحل کنار هم قرار گرفتن قطعات سنتز شده ویروس، مانع تکثیر ویروس ها شوند. در این مطالعه نیز نشان داده می شود که ایمونوگلوبولین های شتر(نانوبادی) که از سرم با روش رسوبی سولفات آمونیوم استخراج شدند، احتمالا به دلیل مهار گیرنده های سطح سلول که برای اتصال ویروس مورد نیاز است ، مانع اتصال وسبب مهار تکثیر ویروس *هپاتیت C* می گردد.

۴- **توصیه ترویجی:** براسا نتایج بدست آمده توصیه می شود برای افزایش درمان دربرابر هیاتیتC همراه با داروی رایج از شیر شتر بمدت ۶ ماه استفاده گردد.

منابع:

Alavian, S. M., Adibi, P., & ZALI, M. R. (2005). Hepatitis C virus in Iran: Epidemiology of an emerging infection.

Deffar,K. Shi,H. Li,L. Wang, X. Zhu,H.. (2009) Nanobodies - the new concept in antibody engineering. African Journal of Biotechnology. Vol 8, No 12

El-Fakharany, E. M., Abedelbaky, N., Haroun, B. M., Sánchez, L., Redwan, N. A., & Redwan, E. M. (2012). Anti-infectivity of camel polyclonal antibodies against hepatitis C virus in Huh7. 5 hepatoma. Virology journal, 9(1), 201.

Hosseini, MR .Zibaee,S. Yousefi,M. Taghipour,A. Ghanaei,O . Noras,M (2017). Camel Milk with Pegylated Interferon Alfa-2a and Ribavirin for Treatment-Naive Chronic Hepatitis C Genotype 2/ 3: An Open-Label, Randomized Controlled Trial . Iran Red Crescent Med J. 19(9):e13529. doi: 10.5812/ircmj.13529

Hudson, P. J., & Souriau, C. (2003). Engineered antibodies. Nature medicine, 9(1), 129.

Idrees, M., Lal, A., Naseem, M., & Khalid, M. (2008). High prevalence of hepatitis C virus infection in the largest province of Pakistan. Journal of digestive diseases, 9(2), 95-103.

Krah S, Schröter C, Zielonka S, Empting M, Valldorf B, Kolmar H. Single-domain antibodies for biomedical applications. Immunopharmacology and immunotoxicology. 2016;38(1):21-8.

8-Redwan EM, EL-Fakharany EM, Uversky VN, Linjawi MH. Screening the anti infectivity potentials of native N-and C-lobes derived from the camel lactoferrin against hepatitis C virus. BMC complementary and alternative medicine. 2014;14(1):219.

Saltanat, H., Li, H., Xu, Y., Wang, J., Liu, F., & Geng, X. H. (2009). The influences of camel milk on the immune response of chronic hepatitis B patients. Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi= Chinese journal of cellular and molecular immunology, 25(5), 431-433.

Susser S, Vermehren J, Forestier N, Welker MW, Grigorian N, Füller C, et al. Analysis of long-term persistence of resistance mutations within the hepatitis C virus NS3 protease after treatment with telaprevir or boceprevir. Journal of clinical virology. 2011;52(4):321-7.

Suzuki, R., Saito, K., Matsuda, M., Sato, M., Kanegae, Y., Shi, G., ... & Wakita, T. (2016). Single-domain intrabodies against hepatitis C virus core inhibit viral propagation and core-induced NFκB activation. Journal of General Virology, 97(4), 887-892.

Ulrichts, H., Silence, K., Schoolmeester, A., de Jaegere, P., Rossenu, S., Roodt, J., ... & Verschueren, K. (2011). Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. Blood, 118(3), 757-765.

Vercruysse, T., Boons, E., Venken, T., Vanstreels, E., Voet, A., Steyaert, J., ... & Daelemans, D. (2013). Mapping the binding interface between an HIV-1 inhibiting intrabody and the viral protein Rev. PLoS One, 8(4), e60259.