

Study of the production and the application of monoclonal antibodies: scFv

Shirin Eyvazi^{1,2}, Mojgan Bandehpour^{1,2*}, Bahram Kazemi^{1,2}

1. Cellular & Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received: 2017/04/24 Accept: 2017/05/31)

Abstract

Background: Since the development of monoclonal antibodies by hybridoma technology the use of antibodies in targeted therapy has been considered. ScFv (single-chain variable fragment) is a small fragment of monoclonal antibody which binds to its target, especially. The goal of this study, is introducing of scFv, its production pathways as well as its diagnostic and therapeutic applications.

Materials and Methods: This study is presented as a review article. All data were extracted from Google Scholar, PubMed, Scopus and Elsevier, using keywords; scFv antibody, scFv application, scFv libraries and phage display technology. About 73 articles were selected and investigated completely.

Findings: The average lengths and weight of fetuses, the sham-exposed group compared to the treatment groups showed no significant difference. The number of vessels in the treatment groups compared to the control group showed a significant increase (150 mg/kg, $p < 0.01$). Investigate length of vessels just in 150 doses significant was seeing aqueous treatment ($p < 0.05$).

Conclusion: Although specificity and affinity of scFv is similar to whole antibody, however, its size is decreased. The size reduction leads to better penetration of scFv into tissues and access to the antigens. The size reduction, also facilitates the manipulation of antibody and the conjugation different drug compounds and diagnostic nanoparticles to it. Therefore, scFvs have been used in researches, successfully.

Keywords: Monoclonal Antibodies, scFv, Phage Display Technology

*Corresponding author: Mojgan Bandehpour
Email: m.bandehpour@sbmu.ac.ir

مروری بر تولید و کاربرد آنتی بادی های منوکلونال تک زنجیره ای: scFv

شیرین عیوضی^{۱،۲}، مژگان بنده پور^{۱،۲*}، بهرام کاظمی^{۱،۲}

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۰۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۱۰

چکیده:

سابقه و هدف: استفاده از آنتی بادی ها برای درمان هدفمند بیماری ها از زمان توسعه آنتی بادی های منوکلونال از طریق تکنولوژی هیبریدوما مورد توجه قرار گرفت. scFv (قطعه متغیر آنتی بادی تک زنجیره ای) قطعه کوچکی از آنتی بادی منوکلونال است که می تواند بصورت اختصاصی به آنتی ژن هدف خود متصل شود. هدف این مطالعه معرفی scFv، راه های تولید آن و نیز کاربرد های آن در زمینه های درمانی و تشخیصی است.

مواد و روش بررسی: این مطالعه بصورت مروری و با استفاده از جستجوی کلمات کلیدی از جمله scFv antibody, phage display technology, scFv application و scFv libraries در پایگاههای Google Scholar, Scopus PubMed و Elsevier انجام شده است. حدود ۷۵ مقاله انتخاب شد که بطور کامل مورد بررسی قرار گرفتند.

نتیجه گیری: با وجود اینکه میزان اختصاصیت و تمایل این آنتی بادی به آنتی ژن مشابه آنتی بادی کامل است، اما اندازه آن کاهش یافته است. کاهش اندازه scFv به نقوذ بهتر آن در بافت ها و دستیابی به آنتی ژن مورد نظر کمک می کند. همچنین با کاهش اندازه scFv، دستکاری آن نیز تسهیل شده و اتصال آنتی بادی به انواع ترکیبات دارویی و نانوذرات تشخیصی امکانپذیر می گردد. بنابراین استفاده از scFv در پژوهش های صورت گرفته با موفقیت همراه بوده است.

واژگان کلیدی: آنتی بادی های منوکلونال، scFv تکنیک نمایش فازی

مقدمه:

نظر مولکولی دو ظرفیتی است و از دو محل به آنتی ژن متصل میشود. مناطق متصل شونده به آنتی ژن به شدت متنوع بوده و ناحیه متغیر آنتی بادی را تشکیل می دهند (۱) (تصویر ۱). این ناحیه بوسیله نوترکیبی و جهش های سوماتیک بوجود می آید. ناحیه متغیر آنتی بادی از شش لوپ تشکیل دهنده نواحی تعیین کننده مکمل (CDRs, Complementarity determining regions (CDRs)) و قسمت

آنتی بادی ها، گروهی از گلیکوپروتئین های مشابه ساختاری و عملکردی هستند که در پاسخ به مواجهه با جسم خارجی یا آنتی ژن در سرم مهره داران تولید می شوند. عملکرد آنتی بادی ها در پاسخ ایمنی عبارت است از: اتصال به آنتی ژن و ممانعت از اتصال آن به گیرنده های روی سلول های هدف، و نیز پوشاندن میکروارگانیسم های مهاجم به منظور شناسایی و تخریب توسط سایر اجزای سیستم ایمنی. ساختار یک مولکول آنتی بادی از

* نویسنده مسئول: مژگان بنده پور

پست الکترونیک: m.bandehpour@sbmu.ac.ir

موشی بیان کننده یک آنتی بادی اختصاصی به سلول های لنفوسیت B سرطانی (میلوما)، سلول هیبریدی بوجود می آید که دارای خصوصیات هر دو سلول بوده و با کشت نامحدود در *in vitro* آنتی بادی اختصاصی مورد نظر را تولید می کند. اولین آنتی بادی مونوکلونال مجاز، آنتی بادی Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3) بود که برای استفاده در جلوگیری از رد پیوند کلیه پذیرفته شد. این آنتی بادی، یک IgG2a موشی بود که به آنتی ژن CD3 بیان شده بر روی لنفوسیت های T، متصل شده و از عملکرد آن ها جلوگیری می کرد (۵). اما استفاده درمانی از این آنتی بادی و سایر آنتی بادی های مونوکلونال که از تکنیک هیبریدوما بوجود آمده بودند، به دلیل عوارض جانبی مثل تولید آنتی بادی انسانی علیه آنتی بادی موشی (Human anti-mouse antibodies (HAMA) منسوخ شد (۶). از دیگر مشکلات تکنیک هیبریدوما می توان به نبود رده سلولی میلومایی مناسب و نیز بازده کم و ناپایداری ژنتیکی آنها اشاره کرد (۷). امروزه، این موضوع با توسعه تکنولوژی آنتی بادی نوترکیب حل شده است.

تکنولوژی آنتی بادی نوترکیب

در طی ۱۵ سال گذشته با توسعه فناوری DNA نوترکیب، ظهور کتابخانه های ژنی ترکیبی و منابع مختلف بیوانفورماتیکی و نیز روش های کامپیوتری مدل سازی ساختار سه بعدی پروتئین ها، امکان تهیه آنتی بادی های نوترکیب با خواص مطلوب فراهم شده است. این آنتی بادی ها در زمینه های تحقیقاتی، تشخیص و درمان بیماری ها استفاده می شوند. امروزه آنتی بادی ها یک سوم پروتئین های درمانی را در کشورهای توسعه یافته، تشکیل می دهند و ارزش جهانی بازار آنتی بادی تقریباً ۲۰ بیلیون دلار در هر سال است (۸).

با استفاده از روش های مهندسی آنتی بادی، آنتی بادی های نوترکیبی تولید شده اند که به ترتیب کاهش ایمونوژنسیته (immunogenicity) عبارت اند از: آنتی بادی مونوکلونال کایمریک (chimeric monoclonal

های بیرونی آن ها (fram work) تشکیل شده است. ناحیه عامل قسمتی از ناحیه ثابت آنتی بادی است و عملکرد آن را بر عهده دارد (۲). امروزه با ظهور تکنولوژی آنتی بادی نوترکیب انواع مختلفی از آنتی بادی با ویژگی های منحصر به فرد بوجود آمده اند. scFv نوع جدیدی از این آنتی بادی نوترکیب است که با روش های مولکولی از جمله تکنیک نمایش فازی بدست می آید.

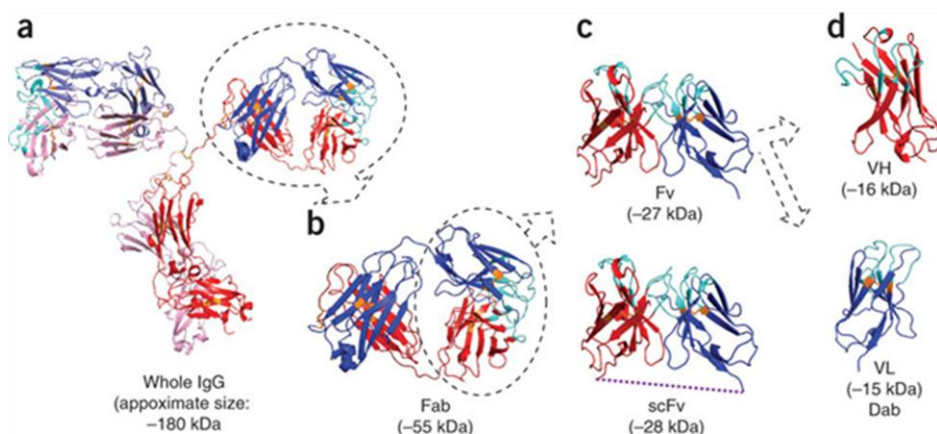
مواد و روشها:

در این مطالعه، با هدف مروری جامع بر منابع موجود در زمینه معرفی scFv، راه های تولید آن و کاربرد های آن در زمینه های دارویی و تشخیصی به جستجو در پایگاه های اطلاعاتی PubMed، Google Scholar، Elsevier و Scopus با استفاده از کلمات کلیدی scFv antibody، phage display technology، scFv application و libraries پرداخته شد. حدود ۷۵ مقاله با اطلاعات کامل انتخاب شدند که بطور دقیق مورد بررسی قرار گرفتند.

ساختار مولکول آنتی بادی کامل و قطعات آنتی بادی: آنتی بادی ها شامل طیف وسیعی از ایمنوگلوبولین کامل IgG (a)، Fab (b)، Fv (دومین های ناحیه متغیر سنگین و سبک) و ScFv (c) و نیز Dab (d) می باشند. ساختارهای آنتی بادی در فرم روبانی نمایش داده شده اند. زنجیره های سنگین به رنگ قرمز و صورتی و زنجیره های سبک به رنگ آبی و آبی کم رنگ نشان داده شده اند. پیوندهای دی سولفیدی درون مولکولی و بین مولکولی نارنجی رنگ و نواحی تعیین کننده مکمل (CDRs) فیروزه ای هستند. اندازه ها بصورت تقریبی و براساس کیلودالتون (kDa) می باشند (۳).

تاریخچه آنتی بادی های مونوکلونال

اولین بار، آنتی بادی های مونوکلونال با معرفی فناوری هیبریدوما (hybridoma) توسط Milstein و Kohler در سال ۱۹۷۵ بر مبنای آزمایشگاهی تولید شدند (۴). در این فناوری با الحاق لنفوسیت های B



تصویر ۱ ساختار مولکول آنتی بادی کامل و قطعات آنتی بادی: آنتی بادی ها شامل طیف وسیعی از ایمنوگلوبولین کامل IgG (a)، Fab (b)، Fv (دومین های ناحیه متغیر سنگین و سبک) و ScFv (c) و نیز Dab (d) می باشند. ساختارهای آنتی بادی در فرم روبانی نمایش داده شده اند. زنجیره های سنگین به رنگ قرمز و صورتی و زنجیره های سبک به رنگ آبی و آبی کم رنگ نشان داده شده اند. پیوندهای دی سولفیدی درون مولکولی و بین مولکولی نارنجی رنگ و نواحی تعیین کننده مکمل (CDRs) فیروزه ای هستند. اندازه ها بصورت تقریبی و براساس کیلودالتون (kDa) می باشند (۳).

است. پپتید اتصال دهنده با داشتن این توالی با حلال، پیوند هیدرونی تشکیل داده و بطور نسبی به پروتئاز مقاوم می شود (۱۵). با کنار هم قرار گرفتن دو یا چهار عدد از scFv ها به ترتیب ساختارهای دیا بادی (diabodies) یا تترا بادی (tetrabodies) بدست می آید که به دلیل افزایش ظرفیت آنتی بادی، شدت اتصال (affinity) افزایش می یابد. همچنین با اتصال دو scFv مختلف به همدیگر سازه های دیابادی دو ظرفیتی بوجود می آید (۱۶).

تولید قطعات آنتی بادی scFv

scFv ها در اصل از هیبریدوما، سلول های طحال موش مواجه شده با آنتی ژن و لنفوسیت های B انسانی ساخته می شوند. روش کار به این صورت است که ابتدا کل mRNA از سلول های فوق استخراج شده و سپس با روش رونویسی معکوس به cDNA تبدیل می شوند. از روی cDNA بدست آمده ژن های متغیر آنتی بادی به روش PCR (polymerase chain reaction) تکثیر می شوند. با این روش کتابخانه های بزرگتر با طیف متنوعی از ژن های V_H و V_L بدست می آید (۱۰) (شکل ۲).

ترتیب دومین ها در ساختار scFv بصورت V_H -L- V_L و یا بصورت V_L -L- V_H است. با وجود اینکه هر دو ترتیب پذیرفته شده است، اما بسیاری از scFv ها بصورت V_H -L- V_L هستند. برای کنار هم قرار دادن قطعات متغیر آنتی بادی از روش هایی مثل PCR assembly و نو ترکیبی *invitro* قطعات تکثیر شده در پلاسمید یا فاژمید استفاده می شود (۱۸) (شکل ۳).

سیستم های بیانی قطعات آنتی بادی scFv

تا کنون انواع مختلفی از سیستم های بیانی مثل سلول های پستانداران، مخمر، گیاهان و سیستم های باکتریایی برای تولید آنتی بادی های نو ترکیب مثل scFv استفاده شده است. در این میان استفاده از میزبان پروکاریوتی مثل *E.coli* به دلایلی مثل خصوصیات فیزیولوژیکی و ژنتیکی مشخص، در دسترس بودن ابزار ژنتیکی، کارکرد آسان و عدم نیاز به تکنیک های پیچیده و گران، اهمیت ویژه ای دارد. چندین روش مختلف برای بیان قطعات آنتی بادی نو ترکیب در *E.coli* استفاده می شود. یک راه آن بیان آنتی بادی scFv بصورت مستقیم در سیتوپلاسم باکتریایی است. بیان سیتوپلاسمی بازدهی بالایی دارد و پروتئین بیان شده حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد از کل پروتئین های باکتری را تشکیل می دهد. اما به دلیل محیط احیا کننده آن، پیوندهای دی سولفیدی بخوبی شکل نمی گیرند و پروتئین بیان شده تجمعات نامحلول و غیر فعال اینکلوزن بادی (inclusion bodies) را تشکیل می دهد (۲۰). برای حل این موضوع محققان از روش های مختلفی بهره می برند مثل استفاده از سویه های *trxB* که آنزیم تیوردوکسین ردوکتاز را بیان نمی کنند (۲۱) و یا بیان scFv بصورت متصل با پروتئین متصل شونده به مالتوز (Maltose binding protein (MBP) (۲۲). همچنین اینکلوزن بادی های بدست آمده را می توان در *invitro* دوباره رناتوره (renature) کرد تا ساختار سه بعدی مناسب خود را بیابند (۲۳). از دیگر روش های بیانی در *E.coli* بیان پروتئین در ناحیه پری پلاسمی با استفاده از یک پپتید نشانه است. با وجود

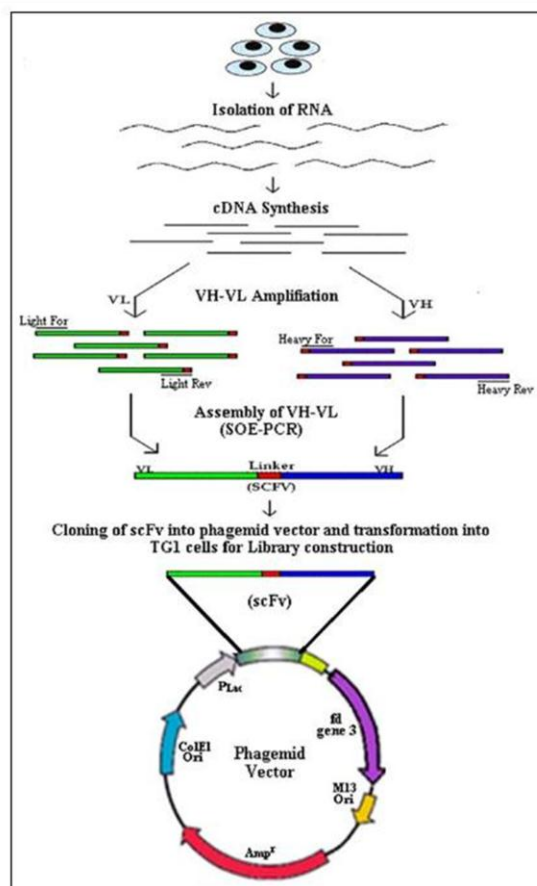
آنتی بادی مونوکلونال انسانی شده (humanized antibody)، آنتی بادی مونوکلونال پرمیاتی (monoclonal antibody)، آنتی بادی مونوکلونال پرمیاتی (primatized monoclonal antibody) و آنتی بادی مونوکلونال انسانی. در آنتی بادی مونوکلونال کایمریک ناحیه ثابت آنتی بادی منشا انسانی و ناحیه متغیر آن منشا موشی دارد. در آنتی بادی مونوکلونال انسانی شده، تنها قسمتهای CDR ناحیه متغیر موشی است و بقیه قسمت های آنتی بادی منشا انسانی دارد (۶). در آنتی بادی مونوکلونال پرمیاتی، ناحیه اتصال به آنتی ژن از یک میمون آزمایشگاهی (cynomolgus macaques) گرفته شده و بقیه قسمت های آنتی بادی انسانی است (۹). در آنتی بادی انسانی همه قسمت های آنتی بادی منشا انسانی دارد. اما تولید آنتی بادی مونوکلونال کامل بسیار آزمایشگاهی و زمانبر است. برای رفع این موضوع تکنیک های جدید مثل نمایش فاژی برای تولید انواع قطعات آنتی بادی نو ترکیب بوجود آمدند.

یکی از مزایای قطعات آنتی بادی مونوکلونال این است که علیرغم کاهش اندازه آنتی بادی، ناحیه اتصال به آنتی ژن آن بصورت کامل باقی مانده است. نفوذ پذیری بهتر به درون تومر، پاکسازی سریع از خون، مدت زمان بقای کمتر در بافت های غیر هدف و همچنین کاهش ایمونوژنسیته از مزایای دیگر قطعات آنتی بادی بشمار می روند (۱۰). تعدادی از قطعات آنتی بادی نو ترکیب عبارت اند از: fab (fragment antigen-binding)، قطعات Fv (variable fragment) و scFv (single-chain variable fragment). Fab قطعه ای از آنتی بادی است که از دو ناحیه متصل شونده به آنتی ژن که هر کدام دارای یک ناحیه ثابت و یک ناحیه متغیر از هر دو زنجیره سبک و سنگین هستند، تشکیل شده است (شکل ۱). در قطعات Fv نواحی متغیر توسط نیروهای غیر کووالانسی کنار هم نگه داشته می شوند. scFv قطعه متغیر تک زنجیره ای است که در آن ژن های متغیر زنجیره سبک (V_L) و زنجیره سنگین (V_H) با یک اتصال دهنده (linker) پپتیدی قابل انعطاف به هم متصل می شوند (۱۱).

آنتی بادی تک زنجیره ای scFv

مولکول scFv کوچکترین قطعه متغیر آنتی بادی تک زنجیره ای است که می تواند بصورت اختصاصی به آنتی ژن هدف خود متصل شود. این مولکول یک آنتی بادی تک ظرفیتی با وزن مولکولی حدود ۲۵-۳۰ کیلدالتون است که در آن زنجیره های متغیر سبک (V_L) و زنجیره متغیر سنگین (V_H) با یک اتصال دهنده پپتیدی انعطاف پذیر بهم متصل شده اند.

(۱۲) (شکل ۱). اولین قطعه scFv توسط دو آزمایشگاه مجزا (Bird و همکاران (۱۳) و Huston و همکاران (۱۴)) در سال ۱۹۸۸ کلود شد. طول و ترکیب اسید آمینه ای پپتید اتصال دهنده در حفظ تاخوردگی صحیح این پروتئین ها مناسب است. بطور معمول پپتید اتصال دهنده حدود ۳/۵ نانومتر طول داشته و شامل ریشه های اسید آمینه ای آبگریز مثل گلابسین و سرین برای انعطاف پذیری و علاوه گلوتامات و لیزین برای افزایش حالیت



تصویر ۲ mRNA بدست آمده از سلول های حلال یا لنفوسیت های بدست آمده از خون محیطی برای ساخت کتابخانه SCFV استفاده می شوند (۱۷).

کردن توالی نوکلئوتیدی مورد نظر به درون ژنوم یک فاژ یا فاژمید به عنوان یک ژن متصل به ژن کد کننده یکی از پروتئین های پوششی فاژ، همراه است. این اتصال موجب می شود که هنگام گرد هم آیی ذرات فاژی، پروتئین مورد نظر نیز در سطح فاژ بیان شود. این درحالی است که توالی کد کننده همان پروتئین در داخل این ذره فاژی وجود دارد. این ارتباط فیزیکی بین فنوتیپ و ژنوتیپ پروتئین بیان شده و قدرت همانند سازی فاژ، عناصر ساختاری تکنولوژی نمایش فاژی را تشکیل می دهند. با استفاده از این تکنیک کتابخانه های متنوعی با چند صد میلیون تنوع از توالی نوکلئوتیدی را به جمعیتی از پروتئین های متنوع نمایش داده شده تبدیل کرده که برای خواص مطلوب غربالگری می شوند (۲۷).

حامل های مورد استفاده در روش نمایش فاژی

دو جزء فیزیکی اصلی در روش نمایش فاژی عبارت اند از: کتابخانه های توالی نوکلئوتیدی کد کننده پپتید یا پروتئین ها و حامل های فاژی که این توالی را بیان می کنند. برای بیان پروتئین مورد نظر در سطح فاژ، سه روش بکار رفته است: در روش اول، توالی نوکلئوتیدی مورد نظر به ژن یک پروتئین پوششی فاژ متصل می شود. در این روش همه پروتئین های بیان شده مورد نظر متصل به پروتئین پوششی فاژ خواهد بود. بنابراین تعداد

اینکه در این حالت تنها پنج تا ده درصد از کل پروتئین های باکتریی نوترکیب خواهد بود، اما به دلیل حضور چاپرون ها و آنزیم هایی مثل دی سولفید ایزومراز، پروتئین بیان شده تاخوردگی مناسبی خواهد داشت (۲۴). روش موفق دیگر برای بیان قطعات آنتی بادی نوترکیب SCFV، بیان آنها در سطح فاژهای رشته ای همراه با تکنیک های انتخاب میل ترکیبی است. این تکنیک که نمایش فاژی (phage display) نامیده می شود، توسط Maccafferty و همکاران ارائه شده و اجازه انتخاب SCFV معین را از کتابخانه های بزرگ زنجیره های متغیر می دهد (۲۵).

تکنیک نمایش فاژی در تولید آنتی بادی تک زنجیره

تکنولوژی نمایش فاژی تأثیرات عمده ای در علوم ایمنی شناسی، زیست شناسی سلولی، علوم گیاهی، کشف داروها و فارماکولوژی داشته است. این تکنیک ابزار بسیار قدرتمندی برای انتخاب پپتیدها یا پروتئین هایی با خواص اتصال ویژه از میان تعداد زیادی از پروتئین های مختلف است. نمایش فاژی بطور اساسی در تهیه کاوشگرهای (prob) مولکولی علیه اهداف اختصاصی و نیز مطالعه، آنالیز و دستکاری برهمکنش های لیگاند و پروتئین کاربرد دارد (۲۶). به بیان ساده نمایش فاژی به بیان پپتیدها یا قطعات آنتی بادی در سطح ذرات فاژی گفته می شود. این بیان با وارد

نشده ۴) جدا کردن فازهای متصل شده و تکثیر آن ها با آلوده کردن یک میزبان باکتریایی .
مراحل غربالگری معمولاً سه تا شش بار تکرار می شوند (۲۶) (شکل ۴).

بیان آنتی بادی های نو ترکیب حاصل از روش نمایش فاز

نمایش فاز یک ابزار مهم در جداسازی و مهندسی آنتی بادی های نو ترکیب است. قطعات آنتی بادی، اولین پروتئین هایی بودند که بصورت موفقیت آمیز با استفاده از یک حامل فاز نمایش داده شدند (۲۵). این کار با اتصال توالی کد کننده قطعه scFv به انتهای آمین ژن III فاز بدست آمد. همانطور که گفته شد این قسمت پروتئین پوششی فاز (g3p) را به پری پلاسم هدایت می کند. در ناحیه پری پلاسم دومین های V_L و V_H بطور صحیح تا خورده و با ایجاد پیوند دی سولفیدی درون مولکولی پایدار و برای تشکیل فرم فعال scFv جفت می شوند.

برای بیان آنتی بادی ها نیز ابتدا از حامل های فاز که همه اطلاعات لازم برای چرخه زندگی فاز را حمل می کنند، استفاده شد (۲۵). سپس سیستم های فائز میدی گسترش پیدا کردند. فائز میدها دارای ژن III برای قرار گیری ژن های کلون شده آنتی بادی و ناحیه بین ژنی فاز برای همانند سازی حلقه غلتان می باشند. فائز میدها کارایی ترانسفورماسیون (transformation) بالایی داشته و بنابراین برای ایجاد مخازن بسیار بزرگ مناسب هستند (۳۳). علاوه بر این می توان آن ها را به منظور ترشح مستقیم قطعات آنتی بادی محلول و بدون انجام ساب کلونینگ (sub cloning) تغییر داد. به این صورت که با قرار دادن یک جهش آمبر (amber mutation) بین توالی نوکلئوتیدی آنتی بادی و ژن III و بیان فائز مید حاصل در یک میزبان مناسب که این جهش را شناسایی کند انجام می شود (suppressor). بدین ترتیب آنتی بادی های حاصل به پروتئین III متصل نشده و بطور مستقیم به ناحیه پری پلاسمی ترشح می شوند (۲۹). بسیاری از فائز میدها از پروموتور lac برای کنترل بیان ژن هیبرید g3p-Ab بهره می برند (۳۳). برای نمایش محصول ژن فیلوژن g3p-Ab، گلوکز به منظور مهار کاتابولیکی پروموتور lac برداشته می شود که این کار منجر به بیان محصول هیبرید کافی برای ذرات فاز تک ظرفیتی می شود.

DNA فائز میدی کد کننده محصول فیلوژن g3p-Ab در ذرات فاز با استفاده از یک فاز کمی مثل M13KO7 یا VCS-M13 که همه پروتئین های ساختاری را فراهم می کنند، تولید می شوند (۳۳). گسترده ترین روش، استفاده از فاز رشته ای است که *E. coli* را آلوده می کند (۳۴). اما سایر سیستم های فاز مانند نمایش روی کپسید T7 (۳۵) و کپسید T4 (۳۶) نیز توسعه پیدا کرده اند.

کتابخانه های طراحی شده برای یافتن آنتی بادی مناسب

چندین نوع کتابخانه نمایش آنتی بادی وجود دارد مثل کتابخانه نمایش فاز و ریبوزومی (mRNA (ribosome display) (۳۷). هر نوع کتابخانه مزیت و محدودیت های مخصوص به خود را داشته و در شرایط مختلف که بستگی به ماهیت آنتی ژن، میل ترکیبی آنتی بادی و تعداد آنتی بادی های مورد انتظار دارد، می تواند مناسب باشد. ژن های V

زیادی از پروتئین های مورد نظر بیان خواهند شد. اما به دلیل این که تمام نسخه های پروتئین پوششی ناقص خواهند شد، زنده بودن فاز تحت تاثیر قرار می گیرد (۲۹).

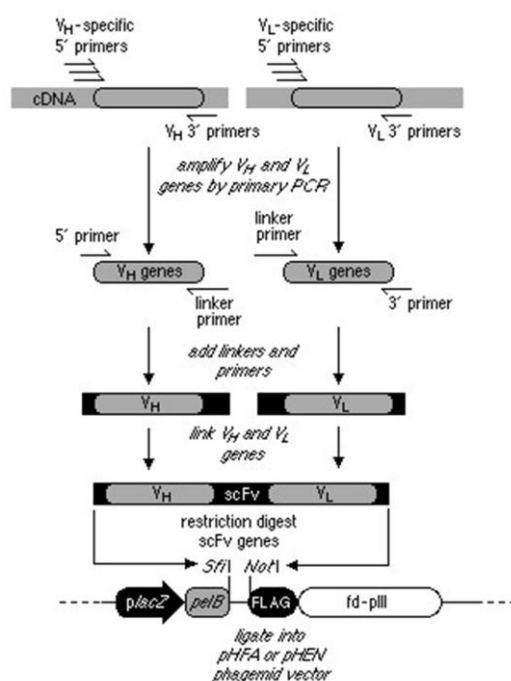
در روش دوم فاز هیبرید تولید می شود. به این صورت که ژن متصل شده به ژن پروتئین پوششی فاز، بصورت یک عنصر اضافی داخل ژنوم فاز قرار می گیرد. بنابراین یک کپی از ژن پوششی سالم باقی می ماند و فاز مورد نظر هر دو نوع پروتئین پوششی وحشی و سالم را بیان خواهد کرد (۳۰).

در روش سوم فاز هیبرید با استفاده از یک روش مبتنی بر فائز مید وجود می آید. در این روش که بطور گسترده استفاده می شود، توالی نوکلئوتیدی مورد نظر روی یک فائز مید حمل می شود و سایر ژن های لازم برای تشکیل فاز، توسط فاز کمی که همراه با فائز مید میزبان باکتریایی را آلوده می کند، حمل می شوند (۳۰).

فازهای مختلفی در سیستم نمایش فاز استفاده می شوند که عبارت اند از: T7، Ff و لامیدا. هر کدام از این فازها با توجه به کاربرد ویژه خود دارای معایب و مزایایی می باشند. در بین آن ها خانواده فاز (fd، f1، M13) Ff حامل های کلونینگ بسیار خوبی هستند (۲۶). این فازها به قطر یک میکرومتر و عرض ۱۰ نانومتر می باشند. از مهمترین مزیت های این فازها این است که اندازه آنها، اندازه DNA خارجی را تحت تاثیر قرار نمی دهد و با جایگزینی DNA بزرگتر، فازهای بزرگتری تشکیل می شود (۳۱). ژنوم این فازها از یک DNA تک رشته ای تشکیل شده که توسط پنج پروتئین پوششی احاطه شده است. در بین این پروتئین ها، پروتئین پوششی اصلی مربوط به ژن VIII است. این پروتئین حدود ۱۰۰۰ نسخه داشته و طول ذره را می پوشاند. چهار پروتئین فرعی دیگر در حدود پنج نسخه در هر ذره از فاز وجود دارند. کلاهیگ g7p و g9p در یک انتهای ذره فاز و کلاهیگ g3p و g6p در انتهای دیگر آن قرار گرفته اند (۳۱). همه این پنج پروتئین در پایداری ساختار فاز شرکت می کنند اما g3p برای شناسایی سلول میزبان و عفونت زایی آن ضروری است. در نتیجه g3p بزرگترین و پیچیده ترین پروتئین پوششی فاز است. هر کدام از ژن های پروتئین های پوششی می توانند بعنوان کاندید اتصال به قطعه ژنی مورد نظر بکار روند. با توجه به تعداد پروتئین های همجوش (fusion) نمایش داده شده، به ازای هر فاز، اثر این پروتئین ها بر روی زنده ماندن فاز متفاوت خواهد بود. بطور کلی تعداد زیادی از پروتئین های کوچک با انتخاب ژن VIII بیان می شوند اما ژن III کاندید اتصال مناسبی برای تعداد کمتری از پروتئین های بزرگ است (۳۰).

غربالگری کتابخانه های نمایش فاز

پس از ساختن کتابخانه های نمایش فاز، کار بعدی غربالگری کتابخانه است. این کار تا جایی که تنوع بسیار زیاد کتابخانه حاصل به تعداد اندک ادامه پیدا می کند. بسیاری از روش های غربالگری براساس انتخاب میل ترکیبی بوده و مراحل زیر را شامل می شود: ۱) تکثیر کتابخانه و تولید ذرات فاز (۲) در معرض هدف (آنتی ژن) قرار دادن ذرات فاز به منظور جستجوی پروتئین متصل شونده معین (۳) شستشوی فازهای متصل



تصویر ۳ اصول scFv PCR assembly، برای ساخت یک ScFv (۱۹).

کتابخانه naïve توالی ژن V که در *in vivo* تحت بازآرایی قرار گرفته است، از IgM mRNA یک حیوان ایمن نشده استفاده می شود. این کار نیاز به روش تهاجمی ندارد زیرا mRNA از لنفوسیت های خون محیطی نیز بدست می آید (۳۹). کتابخانه های سنتتیک در *in vitro* از قطعات ژنومی آنتی بادی بازآرایی نشده به همراه برخی توالی تصادفی اضافی ساخته شده اند. طراحی کتابخانه های سنتتیک براساس توالی CDR است که ناحیه اتصال به آنتی ژن را شکل داده و برای اتصال ضروری هستند (۳۸).

کاربرد های آنتی بادی تک زنجیره ای scFv

به دلیل خصوصیات مطلوب scFv ها از جمله اندازه کوچک، توانایی نفوذ بافتی مناسب، پاکسازی سریع از خون و ایمونوژنیسیته (immunogenicity) محدود، این آنتی بادی ها کاربرد های متنوعی دارند که در زیر به تعدادی از آنها اشاره می شود.

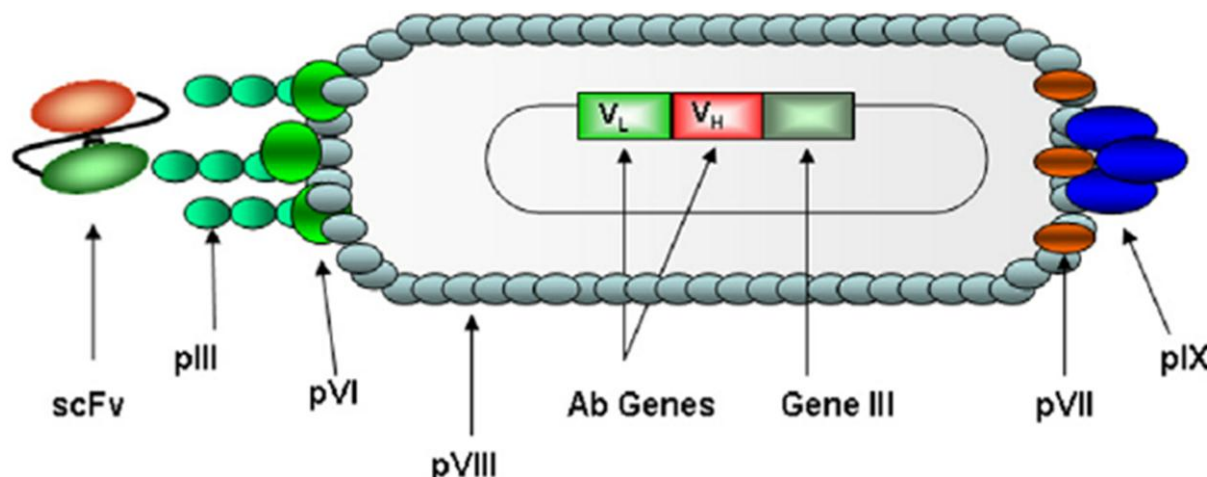
۱- تعیین نقش پروتئین های شناخته شده جدید

یکی از چالش های بزرگ زیست شناسی در محدوده پس ژنومی (post genomic)، دستیابی به روش های معمول برای تعیین عملکرد پروتئین-های شناسایی شده جدید است. این روش ها باید به گونه ای باشند که بتوان آن ها را در مقیاس وسیع (large scale) استفاده کرد. یکی از این روش ها بیان آنتی بادی نو ترکیب درون سلولی علیه پروتئین مورد نظر است که از عملکرد آن جلوگیری می کند. Lisa و همکاران این روش را برای شناسایی عملکرد گیرنده پروتئین مورفوژنیک استخوان ALK3 و گیرنده ۱ فاکتور رشد فیبروبلاست FGFR1 در جنین قورباغه *Xenopus Laevis* بررسی کردند (۴۰). با بیان scFv علیه ALK3 بصورت درون سلولی و

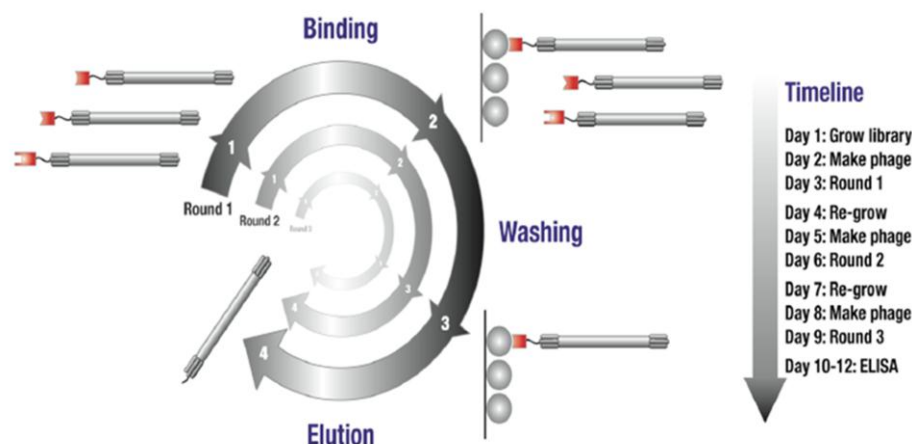
(variable) پستانداران که نواحی متغیر آنتی بادی را کد می کنند، مواد خام را برای ساخت کتابخانه های آنتی بادی ارائه می دهند. این کتابخانه ها براساس اینکه این ژنها از حیوانات ایمن شده بدست آمده اند post immunisation یا از حیوانات ایمن نشده single-pot تقسیم می شوند (۲۶).

کتابخانه های post immunisation در ساخت این نوع کتابخانه ها، توالی IgG معمولاً از لنفوسیت های B طحال حیوانات ایمن شده بدست می آید. مخازن ژن های V جدا سازی و دستکاری شده و در حامل های کتابخانه فاژی دسته بندی می شوند. طبیعی است که برخی انتخاب ها و بلوغ میل ترکیبی توالی برای آنتی ژن بکار گرفته شده، در *in vivo* انجام شده اند. بنابراین با استفاده از کتابخانه های post immunisation قطعات آنتی بادی با اختصاصیت و میل ترکیبی مطلوب بدست می آید (۳۳). اما این کتابخانه ها معایبی هم دارند. یکی از مهمترین آنها این است که ساخت کتابخانه جدید برای هر آنتی ژن ضروری است و اینکار نیاز به کارهای آزمایشگاهی پیچیده، هزینه زیاد و بار اخلاقی به دلیل استفاده از حیوان آزمایشگاهی دارد. همچنین این روش برای آنتی ژن هایی کاربرد دارد که ایمونوژنیک (immunogenic) باشند.

کتابخانه های single-pot در این کتابخانه ها، از روش های ایمن کردن استفاده نمی شود. با استفاده از این کتابخانه ها آنتی بادی هایی با اختصاصیت بالا به طیف گسترده ای از آنتی ژن ها بدست می آیند. دو نوع کتابخانه single-pot وجود دارد: naïve و سنتتیک (۳۸). در حیوانات ایمن نشده، در ابتدا مخزنی از آنتی بادی های انتخاب نشده با IgM غالب می شود که به تعداد متنوعی از آنتی ژن ها متصل می شوند. برای ساخت



تصویر ۴ scFv نمایش داده شده بر روی فاژ. scFv بصورت متصل به پروتئین پوششی pIII فاژ در سطح فاژ نمایش داده می شود. فاژ توان آلوده کردن باکتری *E. coli* را از طریق اتصال pIII به پپلی F باکتری حفظ کرده است (۲۸).



تصویر ۵ مراحل غربالگری تکنیک نمایش فاژی (۳۳).

scFv های جدا شده از کتابخانه های نمایش فاژی می توان بعنوان ممانعت کننده های موثر و اختصاصی مسیرهای پیام رسانی و شناخت عملکرد آن ها استفاده کرد.

۲- جلوگیری از بارداری:

یکی از راه های جلوگیری از بارداری، ممانعت از برهمکنش اسپرم و تخمک است. عوامل غیر اختصاصی کشنده اسپرم مثل Nonoxynol-9 (N-9) که امروزه استفاده می شوند، مشکلاتی از قبیل عفونت های ادراری- تناسلی، التهاب cervicovaginal و تغییرات اپیتلیال را برای مصرف کنندگان آن ها بوجود می آورند (۴۲). یک راه جایگزین برای این عوامل استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال واکنش دهنده با اسپرم است. S19 یک آنتی بادی مونوکلونال IgG1k موشی است که اپی توپ

لنگر انداخته در شبکه آندوپلاسمی، جنین هایی با فنوتیپ مشابه جنین های دارای جهش منفی غالب در ژن این گیرنده بوجود آمدند.

همچنین scFv علیه FGFR1 فنوتیپی مشابه جهش منفی غالب این ژن را نتیجه داد که در آن از تکامل خلفی جنین و تمایز عضله جلوگیری شده بود. Di Lullo و همکاران نیز از scFv برای تشریح فعالیت pax6 در مهاجرت سلول های پیش ساز اولیگودندروسیت ها (Oligodendrocyte precursor cell) (opc) در سیستم عصبی مرکزی جوجه در حال تکامل استفاده کردند (۴۱). در مطالعه آن ها پلاسمید کد کننده scFv علیه ناحیه برون سلولی pax6 به لوله عصبی الکتروپوریت (electroporat) شد. scFv ها با خنثی کردن این ناحیه، باعث کاهش مهاجرت opc شدند. این کار عملکرد دومین برون سلولی pax6 را در مهاجرت سلول های پیش ساز اولیگودندروسیت ها نشان می دهد. بنابراین این نتایج اثبات می کند که از

استروئیدها و آگونیست های β درمان کنند، اما هنوز تعداد زیادی از بیماران علائم این بیماری را نشان می دهند. شبکه پیچیده ای از سیتوکین ها و سلول های درگیر در پاتولوژی آسم امکان استفاده از آنتی بادی های منوکلونال را برای درمان بیماری فراهم می کنند. براساس پژوهش های انجام شده، آنتی بادی های scFv علیه IL4، IL13 و IgE نتایج خوبی برای درمان این بیماری ارائه داده اند (۵۹).

۴- کاربرد های تشخیصی آنتی بادهای تک زنجیره

کاربرد مهم دیگر scFv ها، استفاده آنها در موارد تشخیصی است. بطور معمول آنتی بادی های منوکلونال بخصوص scFv توان اتصال به طیف وسیعی از آنتی ژن ها مثل پروتئین ها، گلیکوپروتئین ها و نیز پاتوژن کامل را دارند (جدول ۲). برای تشخیص scFv متصل شده به آنتی ژن می توان از آنتی بادی ثانویه استفاده کرد که به برچسب (tag) اختصاصی موجود در انتهای N یا C scFv مثل c-myc و E-tag متصل می شود (۳۳). از دیگر کاربرد های تشخیصی می توان به فلوبادی ها (fluobodies) اشاره کرد که ترکیبی از scFv و پروتئین های فلوروسنت هستند. فلوبادی ها را می توان برای نشانه گذاری مستقیم در آزمایشات فلوسیتومتری و ایمنوفلورسانس و نیز در fluorophor-linked immunosorbent enzyme- assay (FLISA) استفاده کرد. FLISA تستی شبیه enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) است. از نظر تئوری scFv به یک پروتئین فلوروسنت متصل می شود و اتصال آنتی ژن با اندازه گیری میزان فلورسنت مشخص می شود. این آزمایش سریعتر و ساده تر از ELISA بوده و نیاز به آنتی بادی ثانویه ندارد (۶۰-۶۴).

عکس برداری در *in vivo* از کاربرد های دیگر scFv هاست. اندازه کوچک scFv ها، دستکاری ژنتیکی آن ها را برای همراه کردن با رادیونوکلوئید ها، کوانتوم دات ها (quantum dot)، نانو ذرات

کشنده است که هیچ درمان موثری ندارد. عامل این بیماری پروتئین های عفونی هستند. پروتئین پریون اسکرابی (PrP^{Sc}) فرم غیر معمول پروتئین پریون سلولی (PrP^C) است. یک رخداد مهم در پاتولوژی این بیماری، تبدیل PrP^C به PrP^{Sc} است که PrP^{Sc} در مغز تجمع می یابد. گیرنده لامینین 37kDa/67kDa (LRP-LR) بعنوان گیرنده پریون شناخته شده و در پاتولوژی آن نقش دارد. در یک مطالعه با انتخاب scFv هایی از کتابخانه های سنتتیک و naïve، علیه این پروتئین و انتقال آن ها به موش C57BL/6 عفونی شده با اسکرابی، میزان پروتئین PrP^{Sc} در طحال این حیوان پس از ۹۰ روز تزریق scFv کاهش یافت. بنابراین scFv تزریق شده از تکثیر محیطی PrP^{Sc} جلوگیری می کند (۵۷).

بیماری آلزایمر: بیماری آلزایمر با نقص پیشرفته حافظه و اختلالات روانشناختی مشخص می شود. علت این بیماری تجمع خود به خودی پپتید چهار کیلو دالتونی حاصل از شکست پروتئین پیش ساز آمیلوئیدی است. بنابراین این پپتید بعنوان هدف جهت درمان در نظر گرفته می شود. scFv ها دارای پتانسیل درمانی مناسبی برای درمان آلزایمر هستند. آن ها به دلیل اینکه فاقد FC هستند، اثرات جانبی مثل منگوانسفالیسیس را که در درمان با آنتی بادی های منوکلونال کامل دیده می شود، نشان نمی دهند. این قطعات همچنین توان عبور از سد خونی مغزی را حتی در موارد تجویز محیطی دارند (۴۵). انتقال scFv علیه انتهای C پپتید از طریق بینی به مدل های موشی مبتلا به این بیماری، منجر به کاهش تعداد پلاک های آمیلوئیدی و congophilic amyloid angiopathy (CAA) در ناحیه کورتکس موش های مبتلا گردید (۵۸).

آسم: آسم یک بیماری التهابی مزمن مسیرهای هوایی است که اثرات قابل توجهی در کیفیت زندگی داشته و در موارد شدید منجر به مرگ می شود. علیرغم اینکه تعدادی از این بیماران می توانند آسم خود را با ترکیبی از

نوع آنتی ژن	روش تهیه scFv	محققان
-------------	---------------	--------

قطعات آنتی بادی با خواص بهبود یافته شده است. ScFv یکی از این آنتی بادی هاست که توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جذب کرده است. ScFv یک آنتی بادی تک زنجیره است که از دو ناحیه زنجیره سنگین و سبک آنتی بادی که توسط یک اتصال دهنده انعطاف پذیر به هم متصل شده اند، تشکیل شده است. با وجود اینکه قدرت اتصال scFv مشابه قدرت اتصال آنتی بادی مونوکلونال کامل است اما اندازه آن حدود یک سوم کاهش یافته است. این کاهش اندازه منجر به نفوذ پذیری بهتر آن به درون تومر، کاهش ایمنونوسیتیت و نیز مدت زمان بقای کمتر در بافت های غیر هدف می شود که از مهمترین مزایای scFv هستند. کاهش اندازه همچنین امکان دستکاری آنتی بادی و اتصال آن را به انواع داروها و نیز ترکیبات تشخیصی تسهیل می کند. ScFv ها با استفاده از تکنیک های قدرتمندی مثل نمایش فاژی و نمایش ریبوزومی بدست می آیند. استفاده های درمانی از برخی از انواع scFv ها، در بیماری های مختلف از جمله سرطان با موفقیت همراه بوده است. این آنتی بادی ها اغلب در ترکیب با انواع داروها و توکسین ها در درمان فازهای بالینی مختلف سرطان مورد استفاده قرار می گیرند. علاوه بر کاربرد های درمانی، کاربردهای تشخیصی این آنتی بادی ها نیز نسبت آنتی بادی های مونوکلونال کامل گسترده تر است. ScFv ها در بسیاری از آزمایش های تشخیصی مثل ELISA، به دلیل نداشتن ناحیه ثابت، موفق تر از آنتی بادی های مونوکلونال کامل، عمل می کنند. همچنین به دلیل اندازه کوچک scFv ها می توان از آن ها در تصویربرداری های *in vivo* استفاده کرد. بنابراین، با توجه به مزایای مهم scFv ها در مقایسه با آنتی بادی کامل و نیز امکان تولید آنها در مقیاس زیاد و با صرف هزینه کم، پیشنهاد می گردد تا پژوهش بیشتری در زمینه استفاده از آنها در موارد تشخیصی و درمانی انجام گیرد. همچنین پیشنهاد می گردد که در راستای این تحقیقات، از روش های مهندسی پروتئین به منظور افزایش نیمه عمر این آنتی بادی ها که از مهمترین چالش های آن ها بشمار می رود، استفاده شود.

منابع:

- Kabat EA. The structural basis for antibody complementary. *Advances in protein chemistry* 1978; 32: 1-75.
- Polonelli L, Pontón J, Elguezal N, Moragues MD, Casoli C, Pilotti E, et al. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS ONE* 2008; 3(6): 2371.
- Tanaka T, Rabbitts TH. Protocol for the selection of single-domain antibody fragments by third generation intracellular antibody capture. *Nature protocols* 2010; 5(1): 67-92.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517): 495-497.
- Sgro C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD³/orthoclone OKT³: bibliographic review. *Toxicology* 1995; 105(1): 23-29.

(Nanoparticle) و غیره را امکان پذیر می کند (۶۱، ۶۲). بنابراین scFv ها ابزار غیر تهجمی برای تجسم محل قرار گیری و توزیع هدف های مشخص در *in vivo* هستند. برای داشتن خواص فارماکوکینتیک مناسب، باید بین نفوذ به اعماق بافت ها و پاکسازی از خون بدون دخالت در میل ترکیبی اتصال آنتی بادی، تعادل برقرار باشد. scFv به دلیل داشتن ترکیبی از خواص فوق به این منظور مناسب است. با وجود اینکه پاکسازی سریع scFv از خون چالش هایی را برای کاربرد های درمانی آن ها بوجود آورده است، اما این خاصیت در کاربرد های تشخیصی عکسبرداری *in vivo* بسیار مناسب است. در یک مطالعه انجام شده توسط Lu RM و همکاران از scFv علیه c-Met (گیرنده فاکتور رشد هپاتوسیت) که در سرطان ریه و سایر سرطان های بدخیم افزایش بیان دارد، استفاده شد. همراه کردن این scFv با کوآنتوم دات ها و تصویر برداری *in vivo* در مدل موشی گزنوگرافت تومری نشان داد که جذب این ذرات در بافت های تومری نسبت به بافت های سالم بیشتر است (۶۳).

استفاده دیگر scFv ها در زمینه تصویر برداری رزونانس مغناطیسی Magnetic resonance imaging (MRI) است (۶۴). با وجود اینکه این تکنیک برای تشخیص تومرها و تعیین نوع درمان مناسب است اما به دلیل حساسیت اندک، کاربرد آن محدود شده است. حساسیت عکس برداری MRI با scFv های همراه شده با نانو ذرات اکسید آهن سوپر پارا مغناطیسی (superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs)) افزایش پیدا می کند. بعنوان مثال همراه کردن SPIONS با scFv علیه آنتی ژن کارسینومامبریونیک که در بسیاری از تومر ها افزایش بیان دارد، نشان داد که این ذرات می توانند حساسیت MRI را در سلول های سرطانی A375M افزایش دهند (۶۴).

بحث و نتیجه گیری:

طی دو دهه ی گذشته پیشرفت ها در زمینه های مهندسی ژنتیک و پروتئین و نیز پیدایش ابزارهای قدرتمند بیوانفورماتیکی، منجر به ظهور

- Ansar W, Ghosh S. Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research. *Indian Journal of Clinical Medicine* 2013; (4).
- Li F, Vijayasankaran N, Shen A, Kiss R, Amanullah A, editors. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*; 2010: Taylor & Francis.
- 0DRQ 0RQFQCDWLERG\RG UXK⁺ Current medicinal chemistry 2007; 14(18): 1978-1987.
- Newman R, Alberts J, Anderson D, Carner K, Heard & 1RUWRQ) HW DO 3ULPDWLJDWLRQ⁺RI UHFRPELQDQW antibodies for immunotherapy of human diseases: a macaque/human chimeric antibody against human CD4. *Nature biotechnology* 1992; 10(11): 1455-1460.
- Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. *Journal of Immunology Research* 2012; 2012.
- Nelson AL, editor Antibody fragments: hope and hype. *MAbs*; 2010: Taylor & Francis.

12. Griffiths AD, Duncan AR. Strategies for selection of antibodies by phage display. *Current opinion in biotechnology* 1998; 9(1): 102-108.
13. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee S-M, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 1988; 242(4877): 423-426.
14. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai M-S, Novotný J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988; 85(16): 5879-5883.
15. Whitlow M, Bell BA, Feng S-L, Filpula D, Hardman KD, Hubert SL, et al. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein engineering* 1993; 6(8): 989-995.
16. Brekke O, Løset G. New technologies in therapeutic antibody development. *Current opinion in pharmacology* 2003; 3(5): 544-550.
17. Shukra A, Sridevi N, Chandran D, Maithal K. Production of recombinant antibodies using bacteriophages. *Akadémiiai Kiadó*, co-published with Springer Science+ Business Media BV, Formerly Kluwer Academic Publishers BV; 2014.
18. Hogrefe HH, Mullinax RL, Lovejoy AE, Hay BN, Sorge JA. A bacteriophage lambda vector for the cloning and expression of immunoglobulin Fab fragments on the surface of filamentous phage. *Gene* 1993; 128(1): 119-126.
19. Galanis M, Irving RA, Hudson PJ. Bacteriophage library construction and selection of recombinant antibodies. *Current Protocols in Immunology* 1997; 17.1. 1-1. 8.
20. Huston J, George A, Tai M, McCartney J, Jin D, Segal D, et al. Single-chain Fv design and production by preparative folding. *Antibody Engineering* 1995: 185-227.
21. Proba K, Ge L, Plückthun A. Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene* 1995; 159(2): 203-207.
22. Vaks L, Benhar I. Production of Stabilized scFv Antibody Fragments in the *E. coli* Bacterial Cytoplasm. *Human Monoclonal Antibodies*: Springer; 2014. p. 171-184.
23. Sánchez L, Ayala M, Freyre F, Pedrosa I, Bell H, Falcón V, et al. High cytoplasmic expression in *E. coli*, purification, and in vitro refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen. *Journal of biotechnology*. 1999; 72(1): 13-20.
24. Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 1988; 240(4855): 1041104-3.
25. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. 1990.
26. Willats WG. Phage display: practicalities and prospects. *Plant molecular biology* 2002; 50(6): 837-854.
27. Hoogenboom HR. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Antibody Phage Display*: Springer; 2002. p. 1-37.
28. RQ3- HDUW\HRQUG 3 2\HQG\5- editors. Antibody production ,design and use for biosensor-based applications. *Seminars in cell & developmental biology*; 2009: Elsevier.
29. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annual review of immunology*. 1994; 12(1): 433-55.
30. Sidhu SS. Engineering M for phage display. *Biomolecular engineering*. 2001; 18(2): 57-63.
31. Marvin D. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current opinion in structural biology* 1998; 8(2): 150-158.
32. García Quiroz F, Sinclair SM. Engineering antibody fragments: replicating the immune system and beyond. *Revista Ingeniería Biomédica* 2010; 4(7): 74-86.
33. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage : methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic acids research* 1991; 19(15): 4133-4137.
34. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228(4705): 1315-1317.
35. Houshmand H, Fröman G, Magnusson G. Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. *Analytical Biochemistry* 1999; 268(2): 363-370.
36. Ren Z, Black L, Lewis G, Wingfield P, Locke E, Steven A. Phage display of intact domains at high copy number: a system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. *Protein science* 1996; 5(9): 1833-43.
37. He M, Taussig MJ. Ribosome display: cell-free protein display technology. *Briefings in functional genomics & proteomics* 2002; 1(2): 204-212.
38. Winter G. Making antibody and peptide ligands by repertoire selection technologies. *Journal of Molecular Recognition* 1998; 11(1-6): 126-127.
39. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of molecular biology* 1991; 222(3): 581-597.
40. Abler LL, Sheets MD. Expression of scfv antibodies in xenopus embryos to disrupt protein function:

Implications for large-scale evaluation of the embryonic proteome. *genesis* 2003; 35(2): 107-113.

41. Di Lullo E, Haton C, Le Poupon C, Volovitch M, Joliot A, Thomas J-L, et al. Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development* 2011; 138(22): 4991-5001.

42. Gupta K, Stapleton AE, Hooton TM, Roberts PL, Fennell CL, Stamm WE. Inverse association of H2O2-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *Journal of infectious diseases* 1998; 178(2): 446-450.

43. Norton E, Diekman A, Westbrook V, Flickinger C, Herr J. RASA, a recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibody directed against the human sperm surface: implications for novel contraceptives. *Human Reproduction* 2001; 16(9): 1854-1860.

44. Deckert P. Current constructs and targets in clinical development for antibody-based cancer therapy. *Current drug targets* 2009; 10(2): 158-175.

45. Monnier PP, Vigouroux RJ, Tassew NG. In vivo applications of single chain Fv (variable domain) (scFv) fragments. *Antibodies* 2013; 2(2): 193-208.

46. Felip E, Del Campo JM, Rubio D, Vidal MT, Colomer R, Bermejo B. Overexpression of c-erbB- γ in epithelial ovarian cancer. Prognostic value and relationship with response to chemotherapy. *Cancer* 1995; 75(8): 2147-2152.

47. Arafat W, Gomez-Navarro J, Buchsbaum D, Xiang J, Wang M, Casado E, et al. Effective single chain antibody (scFv) concentrations in vivo via adenoviral vector mediated expression of secretory scFv. *Gene therapy* 2002; 9(4): 256-62.

48. Barth S, Huhn M, Matthey B, Tawadros S, Schnell R, Schinköthe T, et al. Ki-4 (scFv) $\pm$ (75D QHZ recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice. *Blood* 2000; 95(12): 3909-3914.

49. Zhao S, Zhao G, Xie H, Huang Y, Hou Y. A conjugate of an anti-midkine single-chain variable fragment to doxorubicin inhibits tumor growth. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2012; 45(3): 230-237.

50. Yao Y-d, Sun T-m, Huang S-y, Dou S, Lin L, Chen J-n, et al. Targeted delivery of PLK γ -siRNA by ScFv suppresses Her2+ breast cancer growth and metastasis. *Science translational medicine* 2012; 4(130): 130ra48-ra48.

51. Dou S, Yao Y-D, Yang X-Z, Sun T-M, Mao C-Q, Song E-W, et al. Anti-Her γ single-chain antibody mediated DNMTs-siRNA delivery for targeted breast cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 2012; 161(3): 875-883.

52. Singh R, Samant U, Hyland S, Chaudhari PR, Wels WS, Bandyopadhyay D. Target-specific cytotoxic

activity of recombinant immunotoxin scFv (MUC1)-ETA on breast carcinoma cells and primary breast tumors. *Molecular cancer therapeutics* 2007; 6(2): 562-569.

53. Hao H, Zhen Y, Wang Z, Chen F, Xie X. A novel therapeutic drug for colon cancer: EpCAM scFv-truncated protamine (tp)-siRNA. *Cell biology international* 2013; 37(8): 860-864.

54. Tong Q, Liu K, Lu X-M, Shu X-G, Wang G-B. Construction and characterization of a novel fusion protein MG γ -scFv/SEB against gastric cancer. *BioMed Research International* 2010; 2010.

55. Uchino J, Takayama K, Harada A, Sone T, Harada T, Curiel D, et al. Tumor targeting carboxylesterase fused with anti-CEA scFv improve the anticancer effect with a less toxic dose of irinotecan. *Cancer gene therapy* 2007; 15(2): 94-100.

56. D'Avino C, Paciello R, Riccio G, Coppola M, Laccetti P, Maurea N, et al. Effects of a second-generation human anti-ErbB γ ImmunoRNase on trastuzumab-resistant tumors and cardiac cells. *Protein Engineering Design and Selection* 2014: 65.

57. Zuber C, Knackmuss S, Rey C, Reusch U, Röttgen P, Fröhlich T, et al. Single chain Fv antibodies directed against the 37kDa/67kDa laminin receptor as therapeutic tools in prion diseases. *Molecular immunology* 2008; 45(1): 144-151.

58. Catepoel S, Hanenberg M, Kulic L, Nitsch RM. Chronic intranasal treatment with an anti- β 30-42 scFv antibody ameliorates amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2011;6(4):18296.

59. Zhang Y, Wang B, Yu X, Dai Y, He Y, Cong C, et al. [Ribosome display screening of a novel human anti-IgE scFv fragment]. *Yao xue bao*= *Acta pharmaceutica Sinica* 2012; 47(10): 1329-1335.

60. Oelschlaeger P, Srikanth-Iyer S, Lange S, Schmitt J, Schmid RD. Fluorophor-linked immunosorbent assay: a time-and cost-saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment and enhanced green fluorescent protein. *Analytical Biochemistry* 2002; 309(1): 27-34.

61. Cheng KT. Radioiodinated-anti $\pm$ TAG-72 covalently linked CC49 divalent single-chain Fv antibody. 2007.

62. Kobayashi N, Odaka K, Uehara T, Imanaka-Yoshida K, Kato Y, Oyama H, et al. Toward in vivo imaging of heart disease using a radiolabeled single-chain Fv fragment targeting tenascin-C. *Analytical chemistry* 2011; 83(23): 9123-9130.

63. Lu R-M, Chang Y-L, Chen M-S, Wu H-C. Single chain anti-c-Met antibody conjugated nanoparticles for< i> in vivo</i> tumor-targeted imaging and drug delivery. *Biomaterials* 2011; 32(12): 3265-3274.

64. Vigor KL, Kyrtatos PG, Minogue S, Al-Jamal KT, Kogelberg H, Tolner B, et al. Nanoparticles functionalised with recombinant single chain Fv

antibody fragments (scFv) for the magnetic resonance imaging of cancer cells. *Biomaterials*. 2010;31(6): 1307-1315.

65. Mechaly A, Zahavy E, Fisher M. Development and implementation of a single-chain Fv antibody for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. *Applied and environmental microbiology* 2008; 74(3): 818-822.

66. Nimmagadda SV, Aavula SM, Biradhar N, Sula S, Lingala R, Chandran D, et al. Development of recombinant single-chain variable fragment against hepatitis A virus and its use in quantification of hepatitis A antigen. *Biologicals* 2012; 40(4): 299-308.

67. Ribeiro VdS, Araújo TG, Gonzaga HT, Nascimento R, Goulart LR, Costa-Cruz JM. Development of specific scFv antibodies to detect neurocysticercosis antigens and potential applications in immunodiagnosis. *Immunology letters* 2013; 156(1): 59-67.

68. Wang H, Cole D, Jiang W, Jin H, Fu N, Chen Z, et al. Engineering and functional evaluation of a single-chain antibody against HIV-1 external glycoprotein gp120. *Clinical & Experimental Immunology* 2005; 141(1): 72-80.

69. Pedchenko T, Mernaugh R, Parekh D, Li M, Massion PP. Early detection of NSCLC with scFv selected against IgM autoantibody. *PLoS ONE* 2013; 8(4): 60934.

70. Mohammadzadeh S, Rajabibazl M, Fourouzandeh M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F, Mohammadi M.

Production of Recombinant scFv against p24 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Phage Display Technology. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy* 2014; 33(1): 28-33.

71. van Wyngaardt W, Mashau C, Wright I, Fehrsen J. Serotype- and serogroup-specific detection of African horsesickness virus using phage displayed chicken scFvs for indirect double antibody sandwich ELISAs. *Journal of veterinary science* 2013; 14(1): 95-98.

72. Wang Y, Zhang X, Zhang C, Liu Y, Liu X. Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry¹C toxin from human single fold scFv libraries. *Toxicon* 2012; 60(7): 1290-1297.

73. 5DQL.-DUXHUDQH121HQG53DQUL3 Yamabhai M. One-Step Detection of Aflatoxin-B1 Using scFv-Alkaline Phosphatase-Fusion Selected from Human Phage Display Antibody Library. *Molecular biotechnology* 2011; 49(3): 240-249.

74. Luo Y, Xia Y. Selection of single-chain variable fragment antibodies against fenitrothion by ribosome display. *Analytical Biochemistry* 2012; 421(1): 130-137.

75. Ahangarzadeh S, Bandehpour M, Kazemi B. Selection of single-chain variable fragments specific for *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen using ribosome display. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2017; 20(3): 327.