DOI: 10.22092/VJ.2021.354828.1860
شماره ۱۳۵ تابستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

فناوری پیشرفته نمایش فاژی (Phage display): کاربردها و محدودیت‌های آن در توسعه فرآورده‌های بیولوژیک

• **محمدحسن متدین (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیق و تولید سرم های درمانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **محمدمهدی رنجبر**
بخش تحقیق و تولید واکسن تب برفکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۸-۰۳-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش:۰۹-۰۵-۱۴۰۰
Email: m.motedayen@rvsri.ac.ir

چکیده

فناوری نمایش فاژی، تکنیکی قدرتمند با کاربرد وسیع و روبه رشدی است که کارآیی خودش را در بسیاری از حوزه‌های بیولوژیک نشان داده است. از جمله کاربردهای این فناوری می‌توان به تولید پادتن‌های ضد سموم مار، اکتشافات دارویی، ساخت آنتی‌بادی‌های منوکلونال، تصویربرداری مولکولی، ژن درمانی، تکامل واکسن، جداسازی پپتیدهای قابل اتصال به اجزای زهر، مطالعات ایمنی‌زایی، توسعه‌ی واکسن‌های جدید و فناوری نانو اشاره نمود. یکی از حوزه‌های مهم این فناوری، تولید پادتن‌های ضد سموم جانوران سمی بویژه مارها می‌باشد. با پیشرفت‌هایی که این فناوری در تولید پادتن‌های ضد سموم داشته، به نظر می‌رسد در آینده‌ای نه چندان دور بتوان از این فناوری برای تولید آنتی ونوم‌های نسل جدید و رفع مشکلات آنتی‌ونوم‌های موجود استفاده کرد. با وجود کاربردهای فراوان فناوری نمایش فاژی، این روش نیز همانند سایر تکنیک‌ها، مشکلات و محدودیت‌هایی از جمله: نیاز به مهارت بالا، از دست دادن کلون‌های مورد نظر و یا عدم جفت شدن زنجیره‌های سبک و سنگین متناظر همانند سلول مولد آنتی‌بادی دارد، که در هنگام استفاده از فناوری مذکور ممکن است دیده شوند. در این مقاله مروری سعی شده فناوری نمایش فاژی، کاربردها و محدودیت‌های آن در حوزه‌های مختلف زیستی بررسی گردند.

کلمات کلیدی: فناوری نمایش فاژی، آنتی‌ونوم، فاژمید، کتابخانه فاژی، فاژهای رشته‌ای

Veterinary Researches & Biological Products No 135 pp: 2-12

Advanced Phage Display Technology: Applications and Limitations in development of biological products

By: Motedayen, M. H., (Corresponding Author) Research and Production of Therapeutic Serum Department, Razi Vaccine and serum Research institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran. and Ranjbar, M. M., Research and production of FMD Vaccine Department, Razi Vaccine and serum Research institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran.

Received: 2021-06-08 **Accepted: 2021-07-31**

Email: m.motedayen@rvsri.ac.ir

Phage display technology is a powerful and progressing technique with a wide range of applications that, has proven its effectiveness in many of biological fields, including, production of anti-toxin antibodies, drug discovery, production of monoclonal antibodies, molecular imaging, gene therapy, vaccine development, isolation of specific binding peptides for venom components, studies of immunogenicity, development of new vaccines, and nanotechnology. One of the important areas of this technology is the production of anti-toxin antibodies against venom of poisonous animals, especially snakes. With the advances that this technology has made in the production of anti-toxin antibodies, it seems that in the not too far future, this technology can be used to produce new generation of antivenoms and solving of the existing antivenom problems. Despite of the many applications of the phage display technology, however, like other techniques, it has some problems such as need to high skill, losing the desired clones or no pairing of light and heavy corresponding chains same as the original antibody-producing cells, which may be seen when using the phage display technology. In this review article, an attempt has been made to examine phage display technology, its applications and limitations.

Key words: Phage display technology, Antivenom, phagemid, Phage library, filamentous phages

مقدمه

تکنیک نمایش فاژی، فناوری نسبتا جدید و قدرتمندی است که کاربرد وسیع و روبه رشدی در حوزه‌های مختلف بیولوژیکی دارد. این فناوری که مبتنی بر اتصال مستقیم بین فنوتیپ فاژ و ژنوتیپ آن می‌باشد، امکان بدست آوردن مقادیر انبوهی از پروتئین‌های مخصوص، آنزیم‌ها و پپتیدها در مدت زمان نسبتا کوتاه را فراهم می‌کند، محصولات حاصل از این فناوری، در بسیاری از حوزه‌های پزشکی مدرن استفاده می‌شوند (۱۴). از فناوری نمایش فاژی در حوزه‌های اکتشافات جدید دارويي (۳۰)، تولید پادتن‌های ضد سموم مار (۲۳)، جداسازی پپتیدهای قابل اتصال با ویژگی و میل بالا به اجزای زهر(۱۲)، کشف آنتی‌توکسین‌های پایه آنتی‌بادی (۲۱)، بهبود مطالعات ايمونولوژيكي (۳۳)، پپتیدها، مقلدهاي پپتيدي، تعيين نقشه اپيتوپي(۳۳)، سم‌شناسی (۲۰)، تشخيص و درمان بيماري‌ها، حوزه‌هاي مختلف تكنولوژي پزشكي از جمله حسگرهاي زيستي (۳۰)، پايش و نظارت، تصويربرداری مولكولی، ژن درمانی، تكامل واكسن و فناوری نانو (۳۰)، تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال (۱۴)، مطالعه ی تعامل پروتئین- پروتئین یا لیگاند- پروتئین (۱۵)، ساخت آنتی‌بادی و قطعات آن و بهبود میل پیوندی پروتئین‌ها به گیرنده‌ها، مطالعات ایمنی‌زایی، توسعه‌ی واکسن‌های جدید و تعاملات آلرژن- آنتی‌بادی استفاده شده است (۱۵). یکی از حوزه‌های مهم بیولوژیک که فناوری نمایش فاژی می‌تواند کمک شایانی به آن بنماید، حوزه‌ی آنتی‌ونوم‌ها می‌باشد که برای درمان مار و عقرب گزیدگی در سرتاسر جهان استفاده می‌شوند. مارگزیدگی یک تهدید مهم جهانی است (۱۲، ۲۲). آمار سالانه جهانی مارگزیدگی، پنج میلیون با ۱۵۰۰۰۰ مرگ وبرای عقرب زدگی ۱/۲ میلیون با ۳۰۰۰ مرگ در مناطق روستایی و گرمسیری گزارش شده است (۲۰، ۲۳، ۳۷). در گزارش سازمان بهداشت جهاني آمار مارگزیدگی بیش از ۵ میلیون نفر در جهان اعلام شده که تا ۱۲۵۰۰۰ نفر آنها نیز تلف شده‌اند(۸، ۴۰). در کشور ایران نیز، در گزارشی ده ساله (۱۳۹۰-۱۳۸۱)، آمار مارگزیدگي را ۵۳۷۸۷ نفر با تلفات ۶۷ نفر ذکر کرده‌اند (۲۸). درمان استاندارد و اصلی‌ترین بخش درمان مارگزیده‌ها براساس تجویز آنتی‌ونوم حیوانی حاوی پادتن است (۸، ۱۲، ۲۳، ۲۴). با این حال، صرف نظر از کارآمدی بسیاری از این آنتی ونوم‌ها، به لحاظ اینکه آنها به طور سنتی در حیواناتی مثل اسب و گوسفند تولید می‌شوند، دارای یکسری عوارض جانبی و یا مشکلات پیرامونی هستند که می‌توان به ایمنی‌زایی بالای آن‌ها درمصدومین دریافت‌کننده این سرم‌ها، واکنش‌های زود هنگام آنافیلاکسی و بروز بیماری سرم، گرانقیمت بودن، اختصاصی بودن بخش نسبتا کوچک آن برای آنتی‌ژن‌های زهر و همچنین عدم دسترسی به آنها

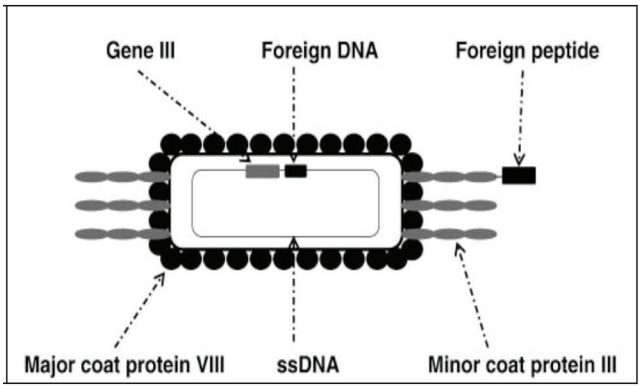
در تمام جهان اشاره کرد(۱۲، ۲۰-۲۴، ۲۸). با پیشرفت‌هایی که فناوری نمایش فاژی در تولید پادتن‌های ضد سموم داشته، به نظر می‌رسد در آینده‌ای نه چندان دور بتوان از این فناوری برای تولید نسل جدید آنتی‌ونوم‌های پلی کلونال و رفع مشکلات آنتی‌ونوم‌های موجود استفاده کرد(۸).

کلیات فناوری نمایش فاژی

تکنیک نمایش فاژی (Phage display) در سال ۱۹۸۵ توسط آقاي اسميت با اتصال دادن پپتید به پروتئین‌های پوششی ذرات فاژي ابداع گرديد(۲۸). این تکنیك به طور کلی شامل سه قسمت ساخت کتابخانه ژنی، غنی‌سازی فاژهای نوترکیب و بیان کتابخانه ساخته شده، می‌باشد:

الف) ساخت کتابخانه ژنی

ساخت کتابخانه مهم‌ترین قسمت این فناوری می‌باشد و مراحل مختلفی به این شرح دارد: ۱- جداسازی سلول، استخراج RNA و ساخت cDNA از آن‌ها. برای اینکار، معمولا total RNA از سلول‌های مورد نظر جداسازی شده و سپس با استفاده از پرایمرهای، Oligo-dT، راندوم هگزامر و یا پرایمرهای اختصاصی و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، تبدیل به cDNA می‌گردند و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن پروتئین مورد نظر تکثیر و تخلیص می‌شود. ۲- کلونینگ ژن تکثیر شده در وکتورفاژمیدی. ژن مورد نظر بعد از تکثیر، از نظر صحت مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر هضم و تخلیص می‌گردد. وکتور فاژمیدی نیز بعد از تکثیر و تخلیص، با همان آنزیم‌های محدودالاثر هضم و سپس تخلیص می‌گردد. بعد، ژن‌های مذکور با استفاده از آنزیم‌های لیگاز در داخل وکتورفاژمیدی، کلون می‌گردند. ۳- ترانسفورماسیون وکتورفاژمیدی نوترکیب به داخل میزبان و تکمیل



شکل ۱- سیستم نمایش فاژی رشته‌ای. در این شکل، پروتئین پوششی اصلی (VIII) و پروتئین پوششی فرعی (III) فاژ و همچنین توالی پپتیدی (foreign peptide) متصل به پروتئین شماره III نشان داده شده است. قطعه ژنی متناظر آن نیز در ژنوم فاژ دیده می شود.

(Janka, B., Ľubomíra, T., Peter, B., Peter, C. 2013 .13)

کتابخانه ژنی. با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن و یا روش شیمیایی کلرید کلسیم، وکتورهای فاژمیدی حاوی ژن‌های کلون شده به داخل باکتری میزبان مستعد شده (competent) ترانسفورم می‌گردند و سپس باکتری‌های مذکور بر روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده می‌شوند. باکتری‌های رشد کرده بر روی پلیت، دارای ژن مورد نظر بوده و مجموعه این باکتری‌ها، کتابخانه ژنی را تشکیل می‌دهند(۲۸). برای اطمینان از کلون شدن ژن مورد نظر و همچنین مشخص شدن تعداد باکتری‌های حاوی فاژمید، تعدادی از کلنی‌های رشد کرده در پلیت، کشت مجدد شده و فاژمید آنها استخراج و هضم آنزیمی و یا تست PCR Colony بر روی آنها انجام می‌گردد(۲، ۲۸).

ب) غنی سازی (Panning)

در داخل کتابخانه ژنی کلون‌های متعددی وجود دارند که محصول پروتئینی/پپتیدی آن‌ها درجات مختلفی از میل ترکیبی را با آنتی‌ژن مورد نظر ما دارند. در طی فرآیند غنی‌سازی، کلون‌هایی که محصولات آنها میل ترکیبی بالایی به آنتی‌ژن هدف دارند از بقیه جداسازی، و سپس به میزان زیادی تکثیر می‌شوند تا جمعیت این دسته از کلون‌ها بسیار زیاد گردد. برای غنی‌سازی، در ابتدا مقداری از کلون‌های (اعضای) کتابخانه کشت می‌گردند سپس به آن فاژ کمکی زده می‌شود که در نتیجه آن فاژهای نوترکیبی ساخته می‌شوند که پروتئین/پپتید مورد نظر را متصل به یکی از پروتئین‌های پوششی خودشان نشان می‌دهند. در مرحله بعدی این فاژهای نوترکیب به سطوح جامدی همچون چاهک‌های میکروپلیت، غشاي پلي‌وينيليدين فلوراید (PVDF)، ایمینوتیوب یا ستون ماتریکس، دانه‌های مغناطیسی، و یا حتی سلول کامل که پیش از آن آنتی‌ژن هدف بر روی آن‌ها تثبیت شده اضافه می‌گردند. فاژهای متصل نشده با شستشو حذف شده و فاژهای متصل را الوت کرده و نهایتا فاژهای نوترکیب مذکور را در باکتری میزبان ای‌کولای تکثیر می‌کنند. برای بدست آوردن آنتی‌بادی‌های منوکلونال با فعالیت مطلوب لازم است که چندین چرخه غنی‌سازی پشت سرهم انجام گردد (شکل ۲) (۲۸،۲).

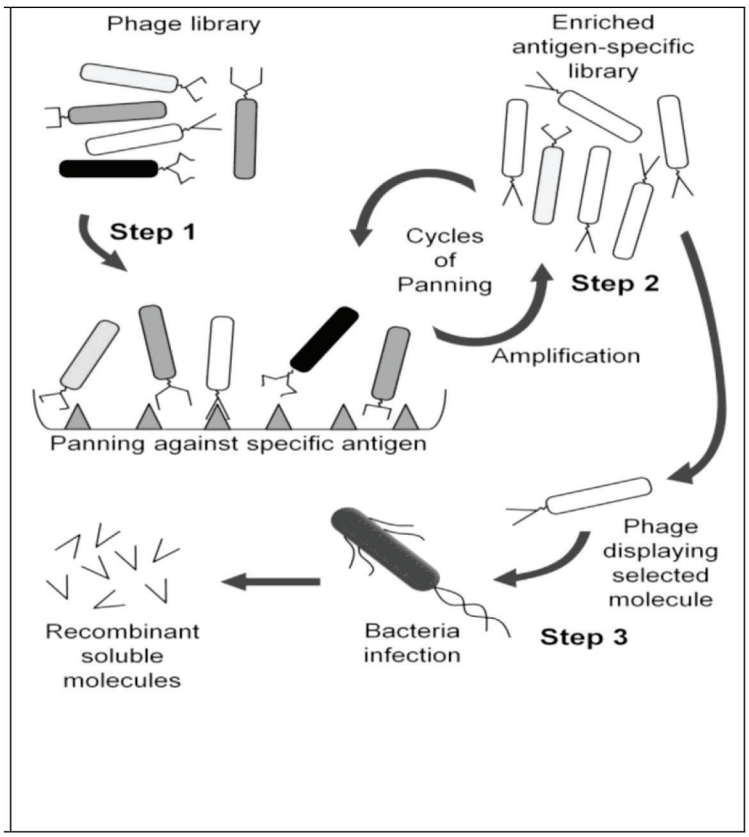
ج) بیان کتابخانه و تخلیص پروتئین/پپتید بدست آمده

برای بیان کتابخانه، مقداری از کلون‌های کتابخانه کشت داده می‌شوند سپس با اضافه کردن IPTG (sopropyl β- d-1-Thiogalactopyranoside) به محیط کشت، میزبان شروع به ساخت پروتئین/پپتید مورد نظر می‌کند بعد از آن، با لیز باکتری و تخلیص لیزات بدست آمده مثلا با روش کروماتوگرافی با ستون حاوی نیکل (Ni-NTA) پروتئین/پپتید مورد نظر تخلیص می‌گردد(۱۸). به طور مثال برای ساخت و بیان کتابخانه ژنی ویژه‌ی قطعه Fab آنتی‌بادی، بعد از جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای و استخراج mRNA آنها و ساخت cDNA، با استفاده از جفت پرایمرهای Forward و Reverse اختصاصی، با استفاده از دستگاه PCR، ژن‌های زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی تکثیر و سپس تخلیص می‌گردند. سپس ژن‌های مذکور بعد از هضم آنزیمی، در یک وکتور فاژمیدی مثلا pComb3X آماده شده، کلون شده و بعدا این فاژمیدهای نوترکیب با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن و یا کلرید کلسیم، به داخل باکتری میزبان (مثلا اشریاشیا کولی) ترانسفورم می‌شوند. مجموعه باکتری‌های میزبان حاوی

فاژمید نوترکیب، به کتابخانه موسوم هستند. در انتها، کتابخانه ساخته شده از نظر صحت وجود ژن مورد نظر و میزان تنوع و تعداد عضو، مورد ارزیابی و تعیین توالی قرار می گیرد. فاژمید pComb3X مورد استفاده، معمولا برای اتصال زنجیره سنگین آنتی‌بادی به پروتئین شماره III فاژ، مهندسی شده است، و فاقد تمامی ژن‌های مورد نیاز برای ایجاد یک فاژ کامل در باکتری میزبان می‌باشد از اینرو برای تأمین ژن‌های تکمیلی مورد نیاز، از فاژکمکی نظیر M13KO7 استفاده می‌گردد که برای این منظور، فاژ کمکی به کشت باکتری میزبان حاوی فاژمید کتابخانه اضافه می‌گردد، که در نتیجه آن، مجموعه‌ای از فاژهای نوترکیب بدست می‌آید که هر کدام از آن‌ها در سطح خودشان یک منوکلونال آنتی‌بادی و در داخلشان ژن متناظر آنتی‌بادی قرار دارد(شکل ۱).

در مرحله بعدی، برای افزایش تعداد فاژهای نوترکیب واکنش داده با آنتی‌ژن مورد نظر، غنی‌سازی انجام می‌گردد، که این امر موجب بدست آوردن مجموعه‌ای از فاژهایی که دارای پروتئین با میل پیوندی بالا برای آنتی‌ژن مورد نظر در سطح‌شان هستند، می‌گردد (شکل ۲) (۸، ۱۰، ۱۴، ۳۳). در طی انجام چرخه‌های غنی‌سازی، فاژهای نوترکیب حاصل از چرخه‌های غنی‌سازی، با تکنیک فاژ الایزا عیارسنجی می‌گردند و در صورت کسب نتایج مطلوب، فاژهای نوترکیب مذکور برای نگهداری به داخل باکتری میزبان ترانس فورم می‌شوند. در مرحله بعد، مقداری از باکتری‌های مذکور کشت داده شده و با زدن IPTG و لیز باکتری‌ها با کمک سونیکاسیون، پروتئین‌های Fab تولیدی با استفاده از روش‌هایی مثلا با کمک ستون کروماتوگرافی Ni-NTA تخلیص می‌شوند. بعد با انجام تست‌های کنترلی، SDS-PAGE و تست بر روی حیوان آزمایشگاهی، محصول تولیدی مورد ارزیابی نهایی قرار می‌گیرد(۱۰، ۱۸).

کتابخانه‌هاي نمايش فاژي



شکل ۲- نمودار شماتیک غنی‌سازی فاژهای نوترکیب در فناوری نمایش فاژی. غنی‌سازی شامل سه مرحله پی در پی است. در مرحله اول، مخلوطی از فاژها بر اساس اتصال آن‌ها به آنتی‌ژن‌های اختصاصی جداسازی می‌گردند. در مرحله دوم، فاژهایی که به آنتی‌ژن‌ها متصل نمی‌شوند با شستشو حذف می‌گردند. غنی‌سازی کلون‌های ویژه آنتی‌ژن (فاژهای نوترکیب ویژه آنتی‌ژن مورد نظر)، با تکرار چرخه‌ها و تقویت شستشوها انجام می‌گردد. در مرحله سوم، برای بیان پروتئین‌های مورد نظر، باکتری میزبان با فاژهای منتخب و غنی‌سازی شده آلوده می‌گردد. (Eduardo, C. R., Lucas, B. C., Gabriela, P., Luciano, C. S., Gilvan, P. F., Jose, E. B. 2015 .8).

فناوری نمایش فاژی، با ساخت کتابخانه شروع می‌شود(۱۰). کتابخانه‌های نمایش فاژی که در ادامه شرح داده شده‌اند، برای جداسازی پپتید، آنتی‌بادی و نانوبادی‌ها طراحی و ساخته می‌شوند (۲۳).

کتابخانه فاژی آنتی‌بادی

معمولا چهار نوع کتابخانه فاژی آنتی‌بادی وجود دارد، که شامل کتابخانه ایمن، بکر، نیمه سنتزی و سنتزی می‌باشند.

کتابخانه‌های ایمن

در اینگونه کتابخانه‌ها، سلول‌های B مولد آنتی‌بادی معمولا از طحال و یا خون محیطی حیوانات/ اشخاص ایمن جداسازی شده و سپس گنجینه ژن‌های متغیر در داخل وکتورهای کتابخانه فاژی کلون می‌شوند. مزیت این نوع کتابخانه‌ها این است که پادتن‌های جداسازی شده از آن‌ها دارای میل ترکیبی و ویژگی بالایی به آنتی‌ژن متناظرخودشان می‌باشند(۱۰، ۱۴، ۲۳، ۳۳).

کتابخانه‌های بکریا نائیو(naive)

برخلاف کتابخانه‌های ایمن که mRNA از ژن‌های متغیر مولکول‌های IgG ساخته شده‌اند، در کتابخانه‌های بکرmRNA از مولکول‌های IgM حیوانات/اشخاص غیرایمن ساخته شده‌اند. احتمال یافتن کلون‌های مولد آنتی‌بادی با میل پیوندی بالا در اینگونه کتابخانه‌ها کمتر از کتابخانه‌های ایمن است. با این‌حال، امکان جداسازی مستقیم آنتی‌بادی با میل پیوندی بالا بر علیه آنتی‌ژن‌های خودی، غیر ایمنی‌زا یا توکسیک، در هنگامی که از یک کتابخانه خیلی بزرگ استفاده می‌گردد وجود دارد(۲۵).

کتابخانه‌های نیمه سنتزی

کتابخانه نیمه‌سنتزی آنتی‌بادی، متشکل از قطعات (scFv (Single-chain variable fragment است که با جایگزینی تصادفی ناحیه CDR3 زنجیره سنگین scFv انسانی بوسیله توالی هشت اسیدآمینه‌ای حاصل از کدون‌های سه نوکلئوتیدی، ساخته شده‌اند. بعد از کلونینگ این قطعات ژنی در وکتور نمایش فاژی، کتابخانه ژنی مثلا به استعداد ۸×۱۰^{۸} کلون مختلف ساخته خواهد شد. تنوع این کتابخانه‌ها بالا بوده و در مدل‌های زنده، نمونه آن وجود ندارد(۵، ۶، ۳۳).

کتابخانه‌های سنتزی

در کتابخانه‌های سنتزی، سلول‌های B در ساخت آنتی‌بادی‌ها نقشی ندارند. ژن‌های آنتی‌بادی در این کتابخانه‌ها، از طریق واکنش PCR مولکول‌های DNA سنتزی تأمین می‌گردند. برجستگی این کتابخانه‌ها ترکیب آن‌ها است که بوسیله مکانیسم‌های تحمل تحت فشار قرار نمی‌گیرند. علاوه برآن، کتابخانه‌های سنتزی ابزاری هستند که بویژه در موقعی‌که کمبود آنتی‌ژن وجود دارد، و یا بدلیل سمی و یا غیرایمنی‌زا بودن آنتی‌ژن امکان ایمنیزاسیون وجود ندارد، می‌تواند مناسب باشد(۴، ۱۴).

کتابخانه فاژی پپتیدی

سه نوع کتابخانه فاژی پپتیدی وجود دارد: کتابخانه خطی هفت پپتیدی، کتابخانه حلقه محدود (loop-constrained) هفت پپتیدی و کتابخانه دوازده پپتیدی. در این‌گونه کتابخانه‌ها، پپتیدهایی که در سطح فاژ بیان می‌گردند کوچک بوده لذا عفونت‌زایی فاژ نوترکیب آسیب نمی‌بینند. تنوع زیاد پپتیدهای ترکیبی بیان شده در سطح فاژهای نوترکیب امکان جداسازی پپتید، تقریبا برعلیه هرگونه آنتی‌ژنی را می‌دهد. کتابخانه‌های پپتیدی در اکتشافات دارویی، شناسایی بیومارکرها و نقشه‌کشی اپیتوپی، کاربردهای فراوانی دارند (۱۹، ۳۳، ۴۱).

محققین زیادي اقدام به ساخت کتابخانه ژنی برای تولید قطعات پروتئینی کرده‌اند مثلا جی نای و همکاران (۱۷) کتابخانه‌ای ایمن حدود پنجاه‌هزار عضوی براي توليد آنتي‌بادي برعليه پروتئين نوترکيب Spike کرونا ويروس بيماري سارس ساخته‌اند. در تحقیقی دیگر، با او و همکاران (۳) یک کتابخانه‌ی ایمن با یک و نیم میلیون عضو برای جداسازی قطعه‌ی Fab پادتن انسانی برعلیه آنتی ژن‌های سلول‌های سرطانی کلورکتال و کارملا و همکاران (۷) با استفاده از total RNA سلول‌های خون محیطی تعدادی از بیماران مبتلا به استئوسارکوما کتابخانه‌ی ایمنی با تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ عضو برای جداسازی Fab بر علیه آنتي‌ژن‌هاي سرطان اوستئو سارکوما ساخته‌اند. همچنین رهبري‌زاده و همکاران (۳۲) دو کتابخانه‌ي ايمن با بيش از ده هزار عضو و هنز و همکاران (۱۱) نيز يك كتابخانه Fab غيرايمن با $۳/۷\times۱۰^{۱۰}$ عضو با استفاده از دو وکتور به ترتيب براي جداسازي قطعه‌ي VHH برعليه آنتي‌ژن‌هاي MUC۱ مرتبط با سلول‌های سرطانی و افزایش تنوع پادتن توليدي طراحی و ساخته‌اند. علاوه برآن متدین و همکاران (۲۷) کتابخانه‌ای با تعداد حدود نیم میلیون عضو برای جداسازی قطعه Fab آنتی‌بادی برعلیه آنتی‌ژن‌های زهر مارهای سمی ایرانی ساخته‌اند. از فاکتورهای مهم براي جداسازي پادتن‌هاي مناسب بر عليه آنتي‌ژن‌هاي دلخواه مي‌توان به اندازه، تنوع، ايمن و يا غيرايمن بودن کتابخانه اشاره کرد به طوری‌که هر چقدر کتابخانه بزرگ‌تر و متنوع‌تر باشد شانس جداسازي پادتن بر عليه آنتي‌ژن مورد نظر نيز افزايش مي‌يابد. لذا محققین با استفاده از روش‌هایی همچون افزایش تعداد نمونه، به کارگیری پرايمرهاي راندوم هگزامر و Oligo-dT برای ساخت cDNA، استفاده از پرايمرهاي بيشتر برای تکثیر ژن‌ها، استفاده از دو نوع وکتور براي کلونينگ مجزاي ژن‌های آنتی‌ژن‌ها، همواره بدنبال افزایش اندازه و تنوع کتابخانه ژنی خود می‌باشند(۲۸).

کاربردهای فناوری نمایش فاژی

از زمان معرفی فناوری نمایش فاژی (Phage display) در سال ۱۹۸۵ کابردهای متعددی برای این تکنیک معرفی شده است (۹) و روز به روز بر دامنه استفاده از این روش نسبتا جدید افزوده می‌گردد که در ادامه به موارد مهم آن پرداخته شده است:

تولید پادتن برعلیه سموم مارهای زهری

در تحقیقی، با استفاده از کتابخانه ژنی ترکیبی موشی، قطعه scFv آنتی‌بادی برعلیه کروتوکسین ساخته شده است. علاوه بر آن با استفاده از کتابخانه‌های ایمن شتری قطعات آنتی‌بادی برعلیه سموم AahI و AahII زهر عقرب *Androctonus australis hector* جداسازی شده است (۸). در تحقیقی دیگر محققین کتابخانه ژنی انسانی scFv ساخته

بودند که کلون‌هایی از آن اثر مهاری بر علیه فعالیت‌های بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی زهر عقرب *Tityus serrulatus* و دیگر گونه‌های این عقرب را از خود نشان داده بود(۸). در تحقیقی دیگر با استفاده از فناوری نمایش فاژی از یک کتابخانه پپتیدی در مورد جداسازی آلفا کبرا توکسین مار کبرای (*N. kaouthia*) ۱۲ کلون با دو توالی متفاوت جدا گردیده، که دو تا از آن‌ها اثر مهاری و سومین کلون اثر تعدیل‌کنندگی بر روی توکسین مذکور داشته‌اند(۲۳). در مطالعه‌ای که در رابطه با استفاده از فناوری نمایش فاژی در مورد دندروتوکسین‌ها انجام شده ۲۵ کلون برعلیه دندروتوکسین B جداشده که در تعیین توالی، ۶ نوع مختلف با درجه بالایی از تفاوت در بین آن‌ها وجود داشته است (۲۳). دندروتوکسین‌ها، توکسین‌های مهم مرتبط پزشکی هستند که موجب انقباضات غیر ارادی عضلات در قربانی می‌شوند (۲۳). چندین برنامه تحقیقی براساس سیستم نمایش فاژی برای کشف آنتی‌بادی ضد سموم مهم انجام گرفته که حاصل آن کشف چند صد فاژ نمایش دهنده پپتید، ده‌ها فاژ حاوی نانوبادی و بالغ بر هزار فاژ نمایش‌دهنده scFv انسانی تاکنون غربالگری و گزینش شده است که در بین آن‌ها ده‌ها پپتید با اثر مهارکنندگی نوروتوکسین‌های مارهای خانواده الاپیده شناسایی شده‌اند (۲۳). همچنین، در دو مطالعه دیگر انجام شده در مورد میوتوکسین‌های B اسپر، ۱۳ پپتید جداشده که درجه بالایی از تنوع را نشان داده‌اند. در آزمایش انجام شده در مورد ۶ تا از آن‌ها، برعلیه میوتوکسین یک مار B آسپر و همچنین آلفا کبرا توکسین مار *N. kaouthia*، واکنش متقابل نشان داده‌اند (۲۳). علاوه برآن براساس نتایج مطالعات نمایش فاژی انجام شده با یک کتابخانه نانوبادی از شتر لاما ایمن شده با زهر کامل *N. kaouthia* به نظر می‌رسد که می‌توان آنتی‌توکسین‌های پایه نانوبادی حتی برعلیه توکسین‌های سایر خانواده مارهایی که ایمن‌سازی برعلیه آنها انجام نشده نیز پیدا کرد(۲۳).

یکی از رهیافت‌ها برای تولید آنتی‌ونوم‌های جدید، فناوری نمایش فاژی است که توجه روزافزونی را برای کشف آنتی‌بادی‌ها و قطعات آن‌ها به خود جلب کرده است (۲۱). از زمانی‌که مک کافرتی در سال ۱۹۹۰ ساخت اولین کتابخانه scFv نمایش فاژی را گزارش کرد یکسری از آنتی‌بادی‌ها و قطعات آن‌ها برای مصارف مختلف به مرحله کلینیکی رسیدند (۲۱). در حوزه تولید آنتی‌ونوم، منج در سال ۱۹۹۵ اولین قطعه scFv موشی را بر اساس تکنولوژی نمایش فاژی بر علیه زهر مار تولید کرد. بعد از آن محققین دیگر ساخت scFv انسانی و VHH شتری برعلیه فسفولیپاز A۲ و توکسین‌های عصبی مارهای افعی و کبرا را گزارش کرده اند(۲۱، ۲۳). در تحقیقی دیگر، يك كتابخانه‌ي پادتن Fab پلي‌كلونال انسانی برعلیه آنتي‌ژن‌هاي زهر تعدادی از مارهای سمی ایرانی ساخته شده است. قطعات Fab بدست آمده قادر بودند که به میزان 5LD50 زهر مار جعفری را در موش‌های آزمایشگاهی خنثی نمایند(۲۷-۲۹). در مطالعه‌ای دیگر از کتابخانه ژنی، مولکول‌های scFv آنتی‌بادی بدست آمده که ۲۰ میکروگرم از آن‌ها، قادر بوده زهر چند مار سمی ایرانی را در موش بالب سی به طور موثری خنثی نماید (۱۸).

ساخت واکسن‌ها

تا به امروز، واکسن‌های ضدسرطان مبتنی بر تکنولوژی نمایش فاژی گزارش شده‌اند (۱۵). به طور مثال گزارش شده که بیان scFv متصل به پروتئین III فاژ می‌تواند پاسخ هومورال Th1 و ایمنی سلولی وابسته به آنتی‌ژن را افزایش دهد (۱۸). همچنین واکسیناسیون با فاژ نوترکیب حاوی اپی توپ آنتی‌ژن MAGE-A1161–169 متصل به پروتئین شماره ۸ از رشد تومور ملانوما جلوگیری و آنرا سرکوب کرده و همچنین فعالیت سلول‌های Kها را افزایش داده است (۱۵). همچنین گزارش شده که موش‌هاي ايمن شده با واكسن نمايش فاژي داراي اپيتوپ محافظت‌كننده سلول B ويروس تنفسي سينسيشيال انساني، مقاومت كامل به اين ويروس را بدست آورده‌اند (۱۵). همچنین، نشان داده شده است که تلقیح موش‌های بالب سی با واکسن DNA فاژی که حاوی کاست گلیکوپروتئین D ویروس هرپس سیمپلکس یک بوده‌اند، منتج به افزایش هردو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی شده است. در مورد واکسن‌های ضد انگلی مثلا یکی از رهیافت‌های واکسیناسیون مالاریا، پپتید SM۱ نمایش داده شده بر روی فاژ است که به طور اختصاصی به همان سطوحی که بوسیله انگل مالاریا مورد حمله قرار می‌گیرد متصل شده و تقریبا به طور کامل تهاجم روده میانی و تهاجم غدد بزاقی بوسیله اسپوروزوئیت‌ها را مهار کرده است. همچنین در حوزه واکسن‌های باکتریایی، كتابخانه‌هاي نمايش فاژي براي شناسايي سروتيپ‌هاي A, B و C نيسريا مننژيتيديس استفاده شده است (۱۵). علاوه برآن، پپتيدهاي جداسازي شده بوسيله غربالگري تصادفي كتابخانه فاژي بر عليه پروتئين فعال‌كننده RNAIII استافيلوكوكوس اورئوس قادر به ايجاد پاسخ‌هاي ايمني در مدل‌هاي موشي بوده است (۱۵). همچنین، از كتابخانه نمايش فاژي لامبدا قطعات DNA ژنوم استرپتوكوكوس پنومونيه و مايكوپلاسما پنومونيه براي شناسايي قطعات حاوي اپيتوپ استفاده شده است. در مورد واکسن‌های ضد قارچی، ژن اپیتوپ نود LKVIRK پروتئين شوك حرارتي كانديدا آلبيكنز با بكارگيري سيستم فاژميدي به پروتئين پوششي شماره ۸ متصل شده و در موش C۵۷BL/۶ بعنوان واكسن ضد قارچي پاسخ ايمني ويژه‌اي را القاء كرده است. در مورد واکسن‌های ضد دارویی، قطعات scFv خاص کوکائین، IgG ویژه‌ي نيكوتين و scFv ویژه‌ي مت آمفتامين با استفاده از فناوری نمایش فاژی به کار رفته‌اند. فاژهایی که قادر به نفوذ به سیستم اعصاب مرکزی (CNS) هستند، برای تولید فاژهای نمایش دهنده‌ی پروتئین‌های متصل به کوکائین به کار رفته‌اند. این پادتن‌های ضد کوکائین اثرات سایکواستیمولاتوری کوکائین را مسدود کرده‌اند. همین‌طور در مورد واکسن‌های ضد اسپرمی، تا به امروز چندین قطعه آنتی‌بادی scFv انسانی شناساگر آنتی‌ژن‌های اسپرم بعنوان پیشگیری کنندگان بالقوه بارداری شرح داده شده‌اند. فناوری نمایش فاژی برای یافتن آنتی‌بادی‌هایی که با آنتی‌ژن‌هایی از اسپرم که با باروری مرتبط هستند استفاده شده‌اند. کتابخانه‌های نمایش فاژی برای جداسازی چندین پپتید ۷ تا ۱۲ اسیدآمینه‌ای با ویژگی اتصال به گلیکوپروتئین زوناپلاسیدای سگی، مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵). در مورد واکسن‌های ضدآلرژی می‌توان گفت که نمایش فاژی یک فناوری پیشرفته است که می‌تواند منجر به تکامل عوامل درمانی و تشخیصی جدید گردد. قطعات Fab با میل پیوندی بالا برای اپیتوپ اتصال به ایمونوگلوبولین E آلرژن برای خنثی‌سازی آلرژن‌ها در شرایط داخل بدنی و ممانعت از اتصال IgE به گیرنده FcεRI و نتیجتا جلوگیری از رهاسازی هیستامین بکار برده شده‌اند. مقلدهای فراهم شده می‌توانند بعنوان

واکسن‌های ضد آلرژی به کار برده شوند (۱۵، ۱۶).

توزیع داخل بدنی واکسن

نمایش فاژی، فناوری قدرتمندی برای طراحی وکتورهای سیستم‌های نوین توزیع داخل بدنی واکسن می‌باشد. با این تکنیک می‌توان سه نوع مختلف آنتی‌ژن‌های واکسنی را توزیع کرد که شامل: ۱- واکسن نمایش فاژی (phage display vaccine) که در آن آنتی‌ژن‌های واکسن در سطح فاژ بیان می‌گردند و یا به طریق شیمیایی به پروتئین‌های پوششی فاژ متصل می‌شوند. ۲- واکسن DNA فاژی (Phage DNA vaccine) در این نوع واکسن، ژن آنتی‌ژن در داخل کاست یوکاریوتی کلون شده و کاست مذکور نیز در داخل ذره فاژی قرار داده شده است. این نوع واکسن مزیت‌های ویژه‌ای دارد از جمله اینکه، فاژها بعنوان ذرات شبه یاور عمل کرده از اینرو این روش نتایج بهتری را با دز کمتر در مقایسه با واکسیناسیون استاندارد فراهم می‌نماید. ۳- واکسن‌های فاژی دورگه (hybrid phage vaccine) که در آن ترکیب دو نوع واکسن استفاده شده است. بدین صورت که در سطح فاژ مولکول‌هایی که برای سلول‌های خاصی نظیر دندرتیک سل‌ها کشش دارند و در داخل ذره فاژی نیز کاست بیان آنتی‌ژن جاسازی شده است. برجستگی واکسن‌های فاژی برپایه ویژگی‌های بنیادی خود ویروس نظیر پایداری بالا در دامنه وسیعی از تغییرات pH استوار است که کاربرد و توزیع آن‌را تسریع کرده ضمن اینکه از نظر اقتصادی نیز تولید ذرات فاژی ارزان است. علاوه برآن، فاژها قادر به تکثیر در سلول‌های یوکاریوتی نیستند از اینرو کاربرد آن‌ها بی‌خطر است. (۱۵).

نقشه‌کشی اپی توپ و یافتن می‌می‌توپ‌ها و طب انتقال خون

نمایش فاژی برای تعیین نقشه اپی‌توپ یا محل اتصال پادتن به آنتی‌ژن استفاده شده است (۳۳). کتابخانه‌های نمایش فاژی پپتیدی ابزار مناسبی برای شناسایی اپی‌توپ‌های ممتد یا خطی درگیر واکنش با پادتن هستند. جداسازی و شناسایی می‌می‌توپ‌ها از کتابخانه‌های پپتیدی رهیافت قدرتمندی برای بهبودی مطالعات ایمونولوژیکی برای طراحی و توسعه کاندیداهای واکسنی می‌باشند. از طریق کتابخانه فاژی پپتیدی و فرآیند غنی‌سازی، فاژهای حامل پپتیدی مقلد اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی را شناسایی می‌کنند(۳۳).

اهمیت نمایش فاژی در کاربردهای خون‌شناسی رو به رُشد است (۱۴). فناوری نمایش فاژی به نظر می‌رسد که بهترین روش برای تهیه مقادیر انبوه آنتی‌بادی‌ها در یک زمان کوتاه باشد. علاوه برآن، آنتی‌بادی‌هایی که بصورت Fab برروی سطح فاژ بیان می گردند فرصت ساخت معرف‌های تایپینگ بسیار حساسی که ۶ تا ۱۵ برابر حساستر از IgG هستند، را می‌دهند. با استفاده از نمایش فاژی امکان فراهم کردن معرف‌های آنتی‌بادی برعلیه گلبول‌های قرمز خون جنینی وجود دارد. گذشته از آن در حوزه‌ی گلبول‌های سفید، آنتی‌بادی برعلیه سلول‌های دندرتیک، سلول‌های مویی، پاراپروتئین‌ها، سلول‌های B و T از کتابخانه‌های انسانی بکر، scFv تهیه شده است. علاوه برآن، ساخت آنتی‌بادی بر علیه یکسری از آنتی‌ژن‌های CD، آنتی ژنهای GPIa و GPIIIa پلاکت، ترومبوکسان B۲ (11D-TX) و فاکتورهای انعقادی گزارش شده است(۱۴).

عوامل درمانی و تشخیصی برای بیماری خودایمنی

با استفاده از نمایش فاژی واکنش‌های آنتی ژن- اتوآنتی بادی در بیماری TTP، یووآیتیس حاد داخلی(AAU)، بیماري گرانولوماتوز وگنر، بیماري خودايمني تيروئيد، خود ايمني ديابت، بيماري تاولي پوستي پمفيگوس ولگاريس و پمفيگوس فولاسئوس، مطالعه شده است (۱۴). چندین شرکت بیوتکنولوژي، از فناوري نمايش فاژي براي توليد آنتي‌بادي‌هاي درماني از جمله بيماري ام اس استفاده مي‌کنند (۱۴). همچنین در مورد اختلالات عصبی، کتابخانه‌های نمایش فاژی برای جداسازی آنتی‌بادی‌های Fab و scFv ضد پریون (prion) انسانی و همچنین ضد تجمع بتاآمیلوئید که می‌تواند در واکسیناسیون بیماری زوال عقل (Alzheimer) بکار رود توصیف شده است(۳۸،۱۴). علاوه برآن، در مورد لانه گزینی بافتی و فعالیت‌های ضد رگزایی به طور مثال گفته شده که اندوتلیوم عروق بافت‌ها و اندام‌های مختلف، گیرنده‌های منحصر به فردی را برای تبادل بیان می‌کنند. این تنوع مولکولی ویژه‌ی بافتی که بوسیله‌ی کتابخانه‌های نمایش فاژی از طریق غنی‌سازی داخل بدنی مشخص شده‌اند، امکان جداسازی پپتیدهای مغزی، کلیوی، ریوی، پوستی، غده‌ی آدرنالی، روده‌ای، پانکراسی، شبکیه چشمی، پروستاتی، پستانی و رحمی را فراهم کرده است. همچنین پپتیدهای نمایش فاژی بدلیل کوچک بودن، فقدان ایمنی‌زایی، نفوذ و توزیع بافتی عوامل بهتری برای تصویربرداری هستند. با استفاده از تکنولوژی نمایش فاژی پپتیدهای زیادی برای هدف‌گیری تومورهای ملفوم سلول‌های B انسانی، گردنی، کولونی، معده‌ای، پستانی، ریوی، کبدی، پروستاتی، بلاستومای عصبی و کارسینومای تیروئیدی کشت سلولی جداسازی شده‌اند(۱۴).

نمایش فاژی داخل بدنی

چندین بیماری که سیستم قلبی و عروقی را درگیر می‌کنند توسط نمایش فاژی داخل بدنی مورد چلنج قرار گرفته‌اند (۱۳). استفاده از فناوری نمایش فاژی داخل بدنی در رات‌های مستعد به سکته خودبخودی و رات‌های با فشار خون طبیعی منجر به شناسایی پپتیدهای مستقر در بافت قلبی گردیده است. کتابخانه فاژی به رات‌هایی که به طور موقت شریان میانی مغزشان مسدود بوده تزریق شده که پپتیدی با سکانس CLEVSRKNC شناسایی و بوسیله ایمونوفلورسانس تایید گردیده است. از نمایش فاژی داخل بدنی برای شناسایی ضایعات انسانی آترواسکلروسیس استفاده شده است. غربالگری کتابخانه فاژی scFv داخل بدنی در رات‌های دیابتی با هدف قرار دادن سلول‌های پانکراسی انجام گرفته است (۱۳). در تحقیقی در رات‌های دیابتی، یک دوره انتخاب داخل بدنی با جداسازی سلول پانکراسی و بدنبال آن انجام دوره‌های بیشتر غنی‌سازی خارج بدنی انجام گرفته است که در طی آن، شش کلون با اتصال ویژه به سلول‌های پانکراسی شناسایی شده است(۱۳).

فاژهای رشته‌ای مورد استفاده در سیستم نمایش فاژی

در فناوری نمایش فاژی، فاژهای رشته‌ای، فاژهای لایتیک شامل T4 و T7 و همچنین فاژ معتدل لامبدا به طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده‌اند(۱، ۱۸، ۲۷،۲۳). که در بین آن‌ها، سیستم باکتریوفاژ M13 به خاطر سهولت

تخلیص از لیزات باکتری اشریاشیا کلی وسیع‌ترین استفاده را در نمایش فاژی داشته (۱۹، ۲۳، ۳۵) و معمولا برای ساخت کتابخانه (۲۱) از آن استفاده می‌شود.

فاژهای رشته‌ای شامل M13، fd و f1 می باشند که مجموعا تحت‌عنوان فاژهاي Ff شناخته می‌شوند. ژنوم آن‌ها بیش از ۹۸٪ مشابه هم مي‌باشند. این فاژها، باکتري اشریاشیا کولی را آلوده مي‌کنند و تیتری بالغ بر 10^{13} ذره در هر میلی‌لیتر محیط کشت از باکتری مذکور را تولید می‌کنند(۹، ۳۵). فاژهاي رشته‌اي بویژه براي نمایش پروتئین، ایده‌آل مي‌باشند. ژنوم M۱۳ کوچك است و داراي يك DNA تك رشته‌اي (ssDNA) با ۶۴۰۷ جفت باز مي‌باشد که یازده ژن را شامل می‌شود. کلونینگ در نواحي غیرضروري خودشان را تحمل مي‌کنند، از این‌رو پروتئین‌هاي پوششي آن‌ها را مي‌توان برای اتصال به پروتئین های بیگانه بدون تغییر در عفونت‌زایي فاژ استفاده کرد. مهم‌ترین خصوصیت این فاژ در مقایسه با دیگر فاژها این است که با زحمت کمتر مي‌توان آنرا تخلیص و مورد استفاده قرار داد. در حقیقت در اینجا باکتري میزبان بعنوان کارخانه تولید فاژ M13 عمل مي‌کند(۳۳، ۳۴). این فاژها باکتري‌هاي میزبان خود را از بین نمي‌برند، اما رشد آن‌ها را بدلیل استرسي که براي تولید فاژ به میزبان وارد مي‌کنند، کاهش مي‌دهند. اینها پنج پروتئین پوششي دارند که پروتئین شماره ۸ فراوان‌ترین آن‌ها با تعداد تقریبی ۲۷۰۰ کپي می‌باشد. فاژ بومی، شکلي استوانه‌اي و نازك دارد و معمولا ۹۰۰ نانومتر طول و ۶ تا ۷ نانومتر قطر دارد. ذرات فاژي از ۵ پروتئین پوششي ساخته شده‌اند. یک سوی فاژ چندین کپي از پروتئین‌هاي شماره ۷ و ۹ دارد، که سرهم‌بندی قطعات فاژ از سمت انتهاي این دو پروتئین آغاز مي‌گردد و در غیاب هر کدام از این دو پروتئین، فاژي تشکیل نمي‌گردد. سمت دیگر فاژ، داراي حدود ۵ کپي از هر کدام از پروتئین‌هاي ۳ و ۶ مي‌باشد، هر دو این پروتئین‌ها براي رها شدن فاژ از غشاء سلولي لازم هستند. سرهم‌بندی فاژ در غشاء پلاسمایي میزبان انجام مي‌گردد و فاژهاي جدید همزمان با ساخته شدن از سلول ترشح مي‌شوند. اولین فرزند ذرات فاژي در مایع رویي کشت حدود ۱۰ دقیقه پس از ورود فاژ به داخل سلول میزبان در دماي ۳۷ درجه پدیدار مي‌گردد. تعداد آنها به صورت تصاعدي تا حدود ۴۰ دقیقه ادامه پیدا مي‌کند. بعد از آن به صورت خطي در مي‌آید (۲۸).

پلی‌پپتیدهای مورد نظر به تمام ۵ نوع پروتئین ساختمانی فاژ فیوز شده و نمایش داده شده‌اند، اما پروتئین‌هاي شماره ۳ و ۸ غالبا براي نمایش پروتئین‌ها یا پپتیدها استفاده می‌گردند. پروتئین شماره ۳ به تعداد ۵ کپي در انتهاي ویریون واقع شده، که به خاطر تحمل آن براي توالي‌هاي بزرگ‌تر، سازگاري آن با نمایش‌هاي تك ظرفیتي، انعطاف‌پذیرتر و دردسترس بودن وکتورهاي مناسب، پروتئین منتخب براي اغلب فیوژن‌هاي نمایش فاژي است. محدودیت‌هایی برای نمایش بر روی پروتئین شماره ۸ وجود دارد بیشتر اوقات، پپتیدهای کوچک را می‌توان به آن متصل کرد، اما تحت شرایطی ممکن است فیوژن‌های بزرگ‌تر نیز نظیر مولکول‌های Fab و یا پروتئین‌های اینتگرال غشاء نیز تحمل گردند. پروتئین شماره سه فیوژن‌های بزرگتری را نسبت به پروتئین شماره ۸ تحمل می‌کند (۹، ۳۹). به غیر از باکتریوفاژهاي خانواده Ff، که براي نمایش فاژي استفاده مي‌شوند، فاژ لامبدا، T4 و T7 نیز هستند که لایتیک بوده و استفاده خیلی محدودتری در نمایش فاژی دارند. این فاژها بیشتر مناسب نمایش یکسري از پروتئین‌هاي طبیعي داخل سلولي مي‌باشند(۹، ۲۸).

محدودیت‌های فناوری نمایش فاژی

فناوری نمایش فاژی همانند بقیه تکنیک‌ها محدودیت‌هایی دارد که تعدادی از آنها به شرح ذیل است:

۱- از آنجائی‌که آنتی‌ژنهای مورد نظر ما ممکن است به مقدار کمی درنمونه خام وجود داشته باشند، که ممکن است موجب تکثیر فاژآنتی‌بادی‌های مورد نظر ما نشود. برای رفع این مشکل بایستی تا آنجایی‌که امکان دارد از آنتی‌ژن‌های تخلیص شده و یا سموم نوترکیب کامل یا حتی قطعات مهم پروتئین مرتبط با آن در مرحله غنی‌سازی استفاده گردد (۸).

۲- گاهی اوقات در هنگام سرهم‌بندی فاژ نوترکیب ممکن است فیوژن‌آنتی‌بادی- پروتئین III به درستی در محل اصلی خودش قرار نگیرد، که این باعث می‌شود که فاژهای وحشی تکثیر پیدا کرده و فاژ نوترکیب حاوی قطعه آنتی‌بادی تکثیر نشوند (۸).

۳- یکی از ویژگی مهم کتابخانه نمایش فاژی تنوع آن است هر چقدر تنوع بیشتر باشد، امکان جداسازی کلون‌های مرتبط با پروتئین/پپتید مورد نظر از کتابخانه مذکور بیشتر است. با این‌حال، احتمال از دست رفتن تنوع محصول پروتئینی در طی مراحل غنی‌سازی و تکثیر فاژهای نوترکیب بدست آمده وجود دارد(۸).

۴- حضور توالی‌های Phage-DNA موسوم به توالی‌های انگلی که با سرعت زیادی در باکتری میزبان تکثیر پیدا می‌کنند. برای رفع مشکل توالی‌های انگلی، از روش تکثیر امولسیون(emulsion amplification) بعنوان روش جایگزین که با وضعیت بهتری فاژهای با رشد آهسته را تکثیر می‌نماید استفاده می‌گردد. (۸).

۵- عدم نمایش پروتئین در سطح همه فاژهای کتابخانه به دلیل سمیت ذاتی پروتئین و یا تداخل با سرهم‌بندی فاژ (۱۰).

۶- احتمال از بین رفتن کلون‌های دلخواه و یا کلون‌های مرتبط با آنتی‌ژن مورد نظر در نتیجه استحصال ضعیف RNA سلولی و یا از دست دادن DNA در مرحله ساخت کتابخانه که نیازمند تخلیص‌های مکرر ژل می‌باشد (۱۰).

۷- احتمال ازدست دادن عملکرد پروتئین پوششی فاژ که محدودیت عمده فناوری نمایش فاژی است که این مشکل را می‌توان با استفاده از فاژهای هیبریدی و تعدیل پروتئین پوششی برطرف نمود(۱۴).

۸- جفت‌شدن زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین تولیدی در فناوری نمایش فاژی، لزوما همانند نحوه جفت بودن آن‌ها در سلول B اولیه که ژن‌های آن مورد استفاده قرار گرفته نمی‌باشد (۱۰).

۹- نمایش فاژی یک فناوری پیچیده بوده و نیازمند مهارت زیاد و زمانبر است (۱۰).

۱۰- گروهی از ذرات فاژی تعداد کپی بیشتر و گروهی دیگر، تعداد کمتری از پروتئین/ پپتید مورد نظر ما را نمایش می‌دهند. گروه اول ممکن است بدلیل ولع با قدرت بیشتری به آنتی‌ژن مورد نظر متصل شده و در فرایند غنی‌سازی بیشتر تکثیر شوند اما گروه دوم با آنکه ممکن است میل بیشتری به آنتی‌ژن مورد آزمایش را داشته باشند، اما از شانس کمتری برای تکثیر برخوردار گردند(۲۳).

نتیجه‌گیری

با وجودی‌که چند دهه از ابداع و معرفی فناوری نمایش فاژی از سال ۱۹۸۵ تاکنون می‌گذرد، این رهیافت هنوز یک روش به روز با پتانسیل استفاده در دامنه وسیعی از حوزه‌های تحقیقی و تولیدی می‌باشد. بدلیل انعطاف‌پذیری بالای این روش، بسیاری از محققین علاقه به استفاده از آن برای یافتن مکانیسم‌های بیماری، بهبود روش‌های تشخیص، و طراحی عوامل بالقوه درمانی و واکسن‌ها دارند (۱۴). در حال حاضر، تکنولوژی نمایش فاژی و کاربردهای آن، موضوع بسیاری از پتنت‌ها است و محصولات درمانی فراهم شده از طریق این تکنولوژی نیز در بازار دیده می‌شوند (۱۴). روش‌های جدید دست‌ورزی DNA با هدف افزایش میل ترکیبی و ویژگی آنتی‌بادی‌های تولید شده با این روش، به کمک فناوری نمایش فاژی آمده‌اند (۸). از سوی دیگر، با پیشرفت و شکوفایی حوزه‌های بیوانفورماتیک آنتی‌بادی و ایمونوانفورماتیک در طراحی اولیه، افزایش افینیتی، بهینه‌سازی خصوصییات فیزیکی-شیمیایی- ساختاری و همچنین انسانی و یا حیوانی‌سازی آنتی‌بادی‌ها، به نظر می‌رسد دورنمای روشنی برای توسعه هر چه بیشتر فن‌آوری نمایش فاژی مهیا شده است (۳۶). در حوزه‌های جدیدی همچون مقابله با SARS-CoV-2 یکی از استراتژی‌های اصلی پیشگیرانه و درمانی به نظر می‌رسد فناوری نمایش فاژی باشد که می‌تواند جهت جلوگیری از آلودگی با ویروس یا تخفیف علائم بیماری کمک شایانی نماید. توسعه کیت‌های تشخیصی نظیر الایزا، تست نواری جریان جانبی (Lateral flow strip test) نیز به طور حیاتی نیازمند به کارگیری و توسعه هرچه بیشتر فن‌آوری نمایش فاژی می‌باشند (۲۶، ۳۱). علاوه برآن باتوجه به افزایش اطلاعات و مقالات و گسترش روزافزون فناوری نمایش فاژی، به نظر می‌رسد که فناوری نمایش فاژی احتمالا به حوزه‌ی تحقیق و توسعه‌ی آنتی‌ونوم‌ها بیش از این راه پیدا کرده و در آینده‌ای نه چندان دور، مولکول‌های زیستی تولید شده با تکنولوژی نمایش فاژی در تولید آنتی‌ونوم‌های تجاری نقش مهمی را داشته باشند (۸، ۲۰).

تشکر و قدردانی

از تمامی همکارانی که به نحوی در تهیه این مقاله کمک و همراهی کرده اند کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Alejandro, G.-M., Jesús, H.-P., Hafiz, M. N. Iqbal, Marco, R.-P. Jorge, B. 2020. Bacteriophage-Based Vaccines: A Potent Approach for Antigen Delivery. *Vaccines*. 8, 504: 1-24.

2. André, F., Jonas, K., Sonja, W., Thomas, S., Michael, H. 2014. Construction of Human Antibody Gene Libraries and Selection of Antibodies by Phage Display. Michael Steinitz (ed.), Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1060, DOI 10.1007/978-1-62703-586-6_12, © Springer Science + Business Media 2014.

3. Bao,P.W., Bing, X., Tian-Mo, W., Ya-Li, Z., Zhen-Shu, Z., Dian-Yuan, Z., Zhuo-Sheng, L. and Chun-Fang, G. 2001. Construction and selection of the natural immune Fab antibody phage display library from patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 7(6):811-815.

4. Bryce, N., Sachdev, S. S. 2012. Synthetic Antibody Libraries. Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. DOI 10.1007/978-1-61779-921-1_2,. 27-41 .Chap:2.

5. Braunage, M. 2003. Construction of semisynthetic antibody libraries. *Recomb Antib Cancer Ther*. 207: 123-32.

6. Braunagel, M., Little, M. 1997. Construction of a semisynthetic antibody library using trinucleotide oligos. *Nucleic Acids Research*. 25(22): 4690–4691.

7. Carmela, D.B., Marcelo, Macedo B. and Andrea, Q. M. 2012. Antibody Phage Display Libraries: Contributions to oncology. *Int J Mol Sci*. 13, 5420-5440.

8. Eduardo, C. R., Lucas, B. C., Gabriela, P., Luciano, C. S., Gilvan, P. F., Jose, E. B. 2015. Phage display as a novel promising antivenom therapy: A review. *Toxicon*. 93, January: 79-84 .

9. Geir, Å. L., Inger, S. 2012. Next generation phage display by use of pVII and pIX as display scaffolds. Methods. 58(1): 40-46

10. Hammers, C. M., Stanley, J. R. 2014. Antibody Phage Display: Technique and Applications. *J Invest Dermatol*. 134(2): 1-13.

11. Hans, J.H., Nicole, V.N., Anneke, R., Simon, E.H., Rob, C.R., Paulla, H., Adriaan, P. B., Jan, W. A., and Hennie, R.H. 1999. A large non immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *The Journal of biological chemistry* , 274(26) June 25: 18218-18230.

12. James, K. T., Matthew, K. K., CDR Jacob, J. G., Yoon, Y. H. 2017. Application of phage display for the development of a novel inhibitor of PLA2 activity in Western cottonmouth venom. *J Venom Res*. 8: 19-24.

13. Janka, B., Ľubomíra, T., Peter, B., Peter, C. 2013. In vivo phage display — A discovery tool in molecular biomedicine. *Biotechnology Advances*. 31(8): 1247-1259.

14. Justyna, B., Ireneusz, C., Andrzej, G. 2012. Phage display—A powerful technique for immunotherapy. 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 8 (12): 1816- 1828.

15. Justyna, B., Ireneusz, C. Andrzej, G. 2012. Phage display—A powerful technique for immunotherapy. 2. Vaccine delivery. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8(12):1829–1835.

16. Jianming, G., Yanlin, W., Zhaoqi L., Zhiqiang W. 2010. Phage display and its application in vaccine design. *Ann Microbiol*. 60:13–19.

17. Jinye, L., Hongxia, S., Yanlin, T., Bin, Y., Lisheng, Q., Xiaoli, Y., Brian, C., Gengxi, H., Hiroshi,T. and Xunjia, C. (2006). Pro-

duction of an anti-severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus human monoclonal antibody Fab fragment by using a combinatorial immunoglobulin gene library derived from patients who recovered from SARS. *Clinical and vaccine immunology*. 13(5): 594–597.

18. Kadkhodazadeh, M., Rajabibazl, M., Motedayen, M. H., Shahidia, S., , Veisi Malekshahi, Z., Azam, R., Yarahmadi, M. 2020. Isolation of Polyclonal Single-Chain Fragment Variable (scFv) Antibodies Against Venomous Snakes of Iran and Evaluation of Their Capability in Neutralizing the Venom. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*.19 (3): 288-296 DOI: 10.22037/ijpr.2019.14400.12358 .

19. Kevin, J., Richard, G., Hardev, S. 2008. Viral therapy of cancer. New Jersey: Wiley online library.

20. Laustsen, A. H., , Gutierrez, J. M., Knudsen, C., Johansen, K. H., Bermúdez-Mendez, E., Cerni, F. A., Jürgensen, J. A., Ledsgaard, L., Martos-Esteban, A., Øhlenschlæger, M., Pus, U., Andersen, M.R., Lomonte, ., Engmark, M., Pucca, M. B. 2018. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*. 146, May: 151-175 .

21. Laustsen, A. H., Lauridsen, L. P., Lomonte, B., Andersen M.l R., Lohse, B. 2017. Pitfalls to avoid when using phage display for snake toxins. *Toxicon*. 126, February: 79-89.

22. Laustsen, A. H., Johansen, K. H., Engmark, M., Andersen, M. R. 2017. Recombinant snakebite antivenoms: A costcompetitive solution to a neglected tropical disease? *PLOS Neglected Tropical Diseases*. February 3: 1-14 .

23. Laustsen, A. H. 2016. Recombinant Antivenoms. Department of Drug Design and Pharmacology Faculty of Health and Medical Sciences University of Copenhagen Universitetsparken 2, DK-2100 Copenhagen, Denmark. andreas. Thesis.

24. Laustsen, A. H., Engmark, M., Milbo C., Johannesen,.J., Lomonted, B., Gutiérrez, J. M. Lohse,.B. 2016. From Fangs to Pharmacology: The Future of Snakebite Envenoming Therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 22: 5270-5293.

25. Li, Y., Han, W.Y., Li, Z.J., Lei, L.C., 2009. Klebsiella pneumoniae MrkD adhesin-mediated immunity to respiratory infection and mapping the antigenic epitope by phage display library. *Microb Pathog*. 46:144-9.

26. Mohammadi, E., Shafiee, F., Shahzamani, K., Ranjbar, M.M., Alibakhshi, A., Ahangarzadeh, S., Beikmohammadi, L., Shariati, L., Hooshmandi, S., Ataei, B., Javanmard, S.H. 2021. Novel and emerging mutations of SARS-CoV-2: Biomedical implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Apr 23;139:111599. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111599 .

27. Motedayen, M.H., Nikbakht, G.R., Rasaee, M.J., Zare Mirakabadi, A. 2015. Construction of a human recombinant polyclonal Fab fragment antibody library using peripheral blood lymphocytes of snake bitten victims. *Archives of Razi Institute*. 70(4): 255-261

28. Motedayen, M.H., 2015. Production of recombinant Fab fragment of polyclonal antibody against venom of poisonous snakes, using a phage display library technique and evaluation of its antivenom activity in Syrian laboratory mouse. University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran, Iran, No: 499, Thesis.

29. Motedayen, M.H., Nikbakht Brojeni, G.H., Rasaee, M.J., Zare Mirakabadi, A., khorasani, A., Eizadi, H., Ranjbar, M.M., Azimi, S.M., Esmaelizad, M. 2018. Production of a Human Recombinant Polyclonal Fab Antivenom against Iranian Viper Echis carinatus. *Archives of Razi Institute*. 73(4): 287-294.

30. Omidfar, K., Daneshpour,M. 2015. Advances in phage display technology for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*.0: 1-19.

31. Nokhodian, Z., Ranjbar, M. M., Nasri, P., Kassaian, N., Shoaei, P., Vakili, B., Rostami, S., Ahangarzadeh, S., Alibakhshi, A., Yarian, F., Javanmard, S. H., & Ataei, B. 2020. Current status of COVID-19 pandemic; characteristics, diagnosis, prevention, and treatment. Journal of research in medical sciences. Official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 25(3): 101. doi. org/10.4103/jrms.JRMS_476_20.

32. Rahbarizadeh, F., Rasaee, M.J., Frozandeh, M.M. and Allameh, A.A. (2003). Production of a recombinant VHH antibody against MUC1 with phage display method and determination of its characteristics. Thesis, Tarbiat Modarres University.

33. Rami, A., Behdani,. M., Yardehnavi, N., Habibi-Anbouhi, M., Kazemi,- Lomedasht,.F. 2017. An overview on application of phage display technique in immunological studies .*Asian Pac J Trop Biomed*. 7(7): 599–602.

34. Rakonjac, J. 2012. Filamentous bacteriophages: biology and applications. Chichester: eLS. John Wiley & Sons Ltd. http://dx.doi.org/ 10.1002/9780470015902.a0000777.

35. Rakonjac, J., Bennett, N.J., Spagnuolo, J., Gagic, D., Russel, M. 2011. Curr. Issues Mol. Biol. 13: 51–76.

36. Ranjbar, M.M., Ebrahimi, M.M., Shahsavandi, S., Farhadi, T., Mirjalili, A., Tebianian, M., Motedayen, M.H. 2019. Novel Applications of Immuno-bioinformatics in Vaccine and Bio-product Developments at Research Institutes. *Archives of Razi Institute*. 74 (3): 219-233.

37. Rodriguez, d. V., R.C., Schwartz, E.F., Possani, L.D., 2010. Mining on scorpion venom biodiversity. Toxicon. 56: 1155- 116.

38. Solomon, B. 2007. Active immunization against Alzheimer's beta-amyloid peptide using phage display technology. *Vaccine*. 25:3053-6.

39. Vithayathil, R., Hooy, R.M., Cocco, M.J. Weiss, G.A. 2011. *J Mol Biol*. 414: 499– 510.

40. WHO, 2013. Animal Bites. World Health Organization, Geneva. Available in: http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs373/en/.

41. Wu, C. H., Liu, I. J., Lu, R.M., Wu, H. C. 2016. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *Journal of Biomedical Science*. 23(8): 1-14.