Research on Medicine *Review Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.41; No.2; 2017

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

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

Backgrond*: 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 7۵ 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 specify 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

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهش در پزشکی

فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

مقاله مروری

دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۹۶، صفحات ۱۳۸ تا ۱۵۱

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

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: ۱۳۹۶/۰۳/۱۰

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 مونوکلونال 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، PubMed Scopus و Elsevier انجام شده است. حدود ۷۵ مقاله انتخاب شد که بطور کامل مورد بررسی قرار گرفتند.*

نتیجه‌گیری: *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 نفوذ 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 فاژی*

مقدمه:

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 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

* **نویسنده مسئول:** مژگان بنده پور

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

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

های بیرونی آن‌ها (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 فاژی بدست می آید.

مواد و روشها:

در این مطالعه، با هدف مروری جامع برمنابع موجود در زمینه معرفی scFv، راه های تولید آن و کاربرد های آن در زمینه های دارویی و تشخیصی به جستجو در پایگاههای اطلاعاتی Google Scholar، PubMed، Scopusو Elsevier با استفاده از کلمات کلیدی scFv antibody, phage display technology, scFv application و scFv 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 (دومین‌های 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 کمرنگ 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).

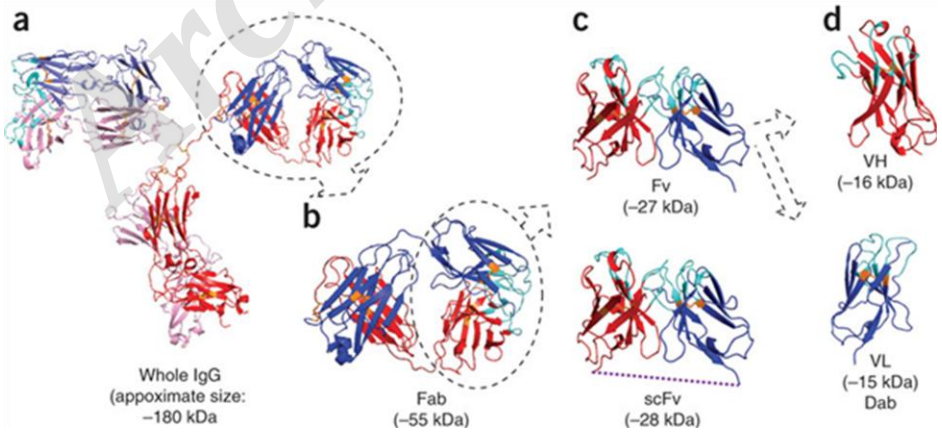
تاریخچه آنتی بادی های مونوکلونال

اولین بار، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با معرفی فناوری هیبریدوما (hybridoma) توسط Kohler و Milstein در سال ۱۹۷۵ در مقیاس آزمایشگاهی تولید شدند (۴). در این فناوری با الحاق لنفوسیت های B 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 منوکلونال 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 منوکلونال 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 روش‌های 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 تقریبا ۲۰ بیلیون دلار در هر سال است (۸).

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



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 کمرنگ 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).

www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

antibody)، آنتی بادی منوکلونال انسانی شده (humanized monoclonal antibody)، آنتی بادی مونوکلونال پریماتی (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 پریماتی، 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 نوترکیب 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 ایمونوژنسیتی از مزایای دیگر قطعات آنتی بادی بشمار می روند (۱۰). تعدادی از قطعات آنتی بادی نوترکیب عبارت اند از: fab (fragment antigen-binding)، قطعات Fv (variable fragment) و scFv (single-chain variable fragment). Fab قطعه ای از آنتی‌بادی 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 آنتی‌بادی 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 ۳۰-۲۵ کیلودالتون 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 شده‌اند

(۱۲) (شکل ۱). اولین قطعه scFv توسط دو آزمایشگاه مجزا (Bird و همکاران (۱۳) و Huston و همکاران (۱۴)) در سال ۱۹۸۸کلون شد. طول و ترکیب اسیدآمینه 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 گلایسین و سرین برای انعطاف پذیری بعلاوه گلوتامات و لیزین برای افزایش حلالیت است. پپتید اتصال دهنده با داشتن این توالی با حلال، پیوند هیدوژنی 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 ساختار های 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) (شکل۲).

ترتیب دومین ها در ساختار scFv بصورت V_L -L- V_H و یا بصورت V_H -L-V_Lاست. 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 نوترکیبی *invitro* قطعات تکثیر شده در پلاسمید یا فاژمید استفاده می شود (۱۸) (شکل۳).

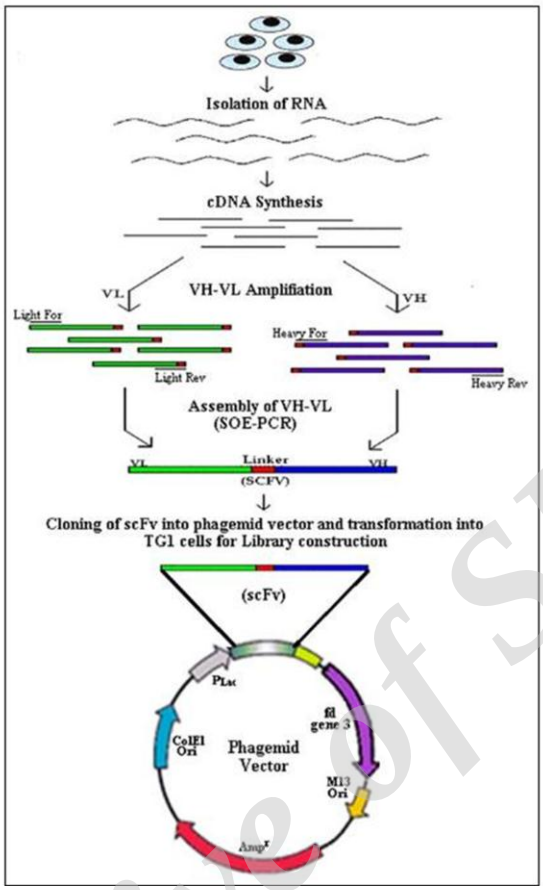
سیستمهای بیانی قطعات انتی بادی scFv

تا کنون انواع مختلفی از سیستم های بیانی مثل سلول های پستانداران، مخمر، گیاهان و سیستم های باکتریایی برای تولید آنتی بادی های نوترکیب 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 نوترکیب 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 اینکلوژن 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 اینکلوژن 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

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017



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

اینکه در این حالت تنها پنج تا ده درصد از کل پروتئین های باکتری 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 تاثیرات 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 اتصالی 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 پپتید ها یا قطعات آنتی بادی در سطح ذرات فاژی گفته می شود. این بیان با وارد 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

Archive of SID
www.SID.ir

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

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

در روش سوم فاژ هیبرید با استفاده از یک روش مبتنی بر فاژمید بوجود می‌آید. در این روش که بطور گسترده استفاده می شود، توالی نوکلئوتیدی مورد نظر روی یک فاژمید حمل می شود و سایر ژن های لازم برای تشکیل فاژ، توسط فاژ کمکی که همراه با فاژمید میزبان باکتریایی را آلوده می کند، حمل می شوند (۳۰).

فاژهای مختلفی در سیستم نمایش فاژی استفاده می شوند که عبارت اند از: Ff، T7 و لامبدا. هر کدام از این فاژها با توجه به کاربرد ویژه خود دارای معایب و مزایایی می باشند. در بین آن ها خانواده فاژ Ff (M13، f1، fd) حامل های کلونینگ بسیار خوبی هستند (۲۶). این فاژها به قطر یک میکرومتر و عرض ۱۰ نانومتر می باشند. از مهمترین مزیت های این فاژها این است که اندازه آنها، اندازه DNA خارجی را تحت تاثیر قرار نمی دهد و با جایگزینی DNA بزرگتر، فاژهای بزرگتری تشکیل می شود (۳۱). ژنوم این فاژها 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 فاژ وجود دارند. کلاهک g7p و g9p در یک انتهای ذره فاژ و کلاهک g3p و g6p در انتهای دیگر آن قرار گرفته اند (۳۱). همه این پنج پروتئین در پایداری ساختار فاژ شرکت می کنند اما g3p برای شناسایی سلول میزبان و عفونت زایی آن ضروری است. در نتیجه g3p بزرگترین و پیچیده ترین پروتئین پوششی فاژ 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 فاژ، اثر این پروتئین ها بر روی زنده ماندن فاژ متفاوت خواهد بود. بطور کلی تعداد زیادی از پروتئین های کوچک با انتخاب ژن VIII بیان می شوند اما ژن III کاندید اتصالی مناسبی برای تعداد کمتری از پروتئین های بزرگ است (۳۰).

غربالگری کتابخانه های نمایش فاژی

پس از ساخته شدن کتابخانه های نمایش فاژی، 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 فاژی ۲) در معرض هدف(آنتی ژن) قرار دادن ذرات فاژی به منظور جستجوی پروتئین متصل شونده معین ۳) شستشوی فاژهای متصل نشده ۴) جدا کردن فاژهای متصل شده و تکثیر آن ها با آلوده کردن یک میزبان باکتریایی .

مراحل غربالگری معمولا سه تا شش بار تکرار می شوند (۲۶) (شکل ۴).

بیان آنتی بادی های نوترکیب حاصل از روش نمایش فاژی

نمایش فاژی یک ابزار مهم در جداسازی و مهندسی آنتی بادی های نوترکیب است. قطعات آنتی بادی، اولین پروتئین هایی بودند که بصورت موفقیت آمیز با استفاده از یک حامل فاژی نمایش داده شدند (۲۵). این کار با اتصال توالی کد کننده قطعه scFv به انتهای آمین ژن III فاژ بدست آمد. همانطور که گفته شد این قسمت پروتئین پوششی فاژ (g3p) را به پری پلاسم هدایت می کند. در ناحیه پری پلاسم دومین های V_H و V_L 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 فاژی که همه اطلاعات لازم برای چرخه زندگی فاژ را حمل می کنند، استفاده شد (۲۵). سپس سیستم های فاژمیدی گسترش پیدا کردند. فاژمیدها دارای ژن III برای قرار گیری ژن های کلون شده آنتی بادی و ناحیه بین ژنی فاژی برای همانند سازی حلقه غلتان می باشند. فاژمیدها کارآیی 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 فاژمید 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 فاژمیدها از پروموتر lac برای کنترل بیان ژن هیبرید g3p-Ab بهره می برند (۳۳). برای نمایش محصول ژن فیوژن g3p-Ab، گلوکز به منظور مهار کاتابولیکی پروموتر lac برداشته می شود که این کار منجر به بیان محصول هیبرید کافی برای ذرات فاژ تک ظرفیتی می شود.

DNA فاژمیدی کد کننده محصول فیوژ g3p-Ab در ذرات فاژ با استفاده از یک فاژ کمکی مثل M13KO7 یا VCS-M13 که همه پروتئین های ساختاری را فراهم می کنند، تولید می شوند(۳۳). گسترده‌ترین روش، استفاده از فاژ رشته ای است که *E.coli* نر را آلوده می کند(۳۴). اما سایر سیستم های فاژی مانند نمایش روی کپسید T7 (۳۵) و کپسید T4 (۳۶) نیز توسعه پیدا کرده‌اند.

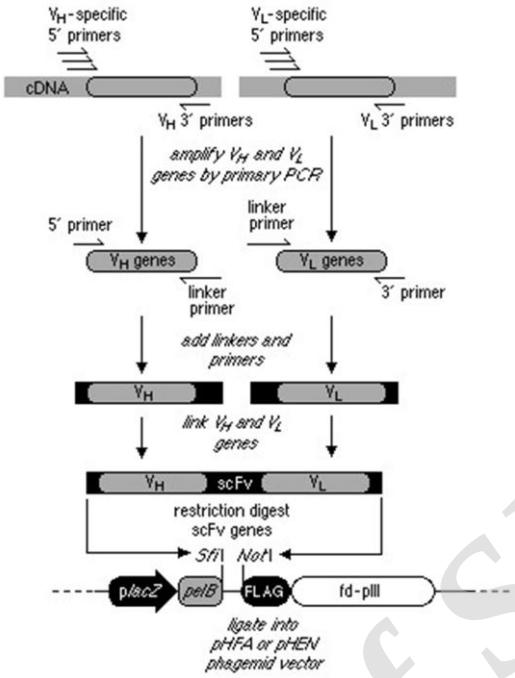
کتابخانه های طراحی شده برای یافتن آنتی بادی مناسب

چندین نوع کتابخانه نمایش آنتی بادی وجود دارد مثل کتابخانه نمایش فاژی و ریبوزومی (ribosome display) mRNA (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. ژن‌های V

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017



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

(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 معمولا 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 *invivo* انجام شده‌اند. 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 ایمنوژنیک (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 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

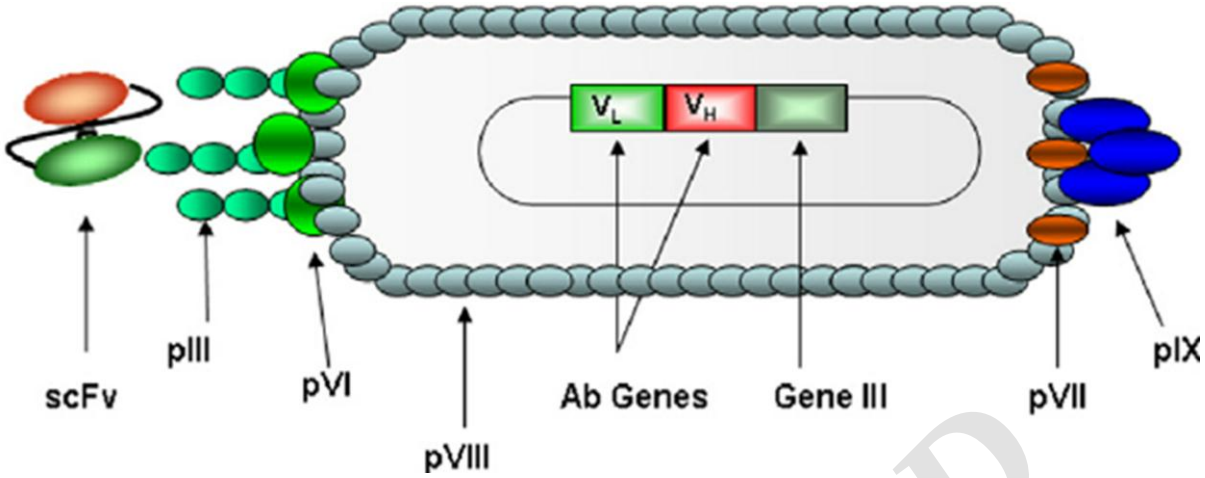
به دلیل خصوصیات مطلوب scFvها از جمله اندازه کوچک، توانایی نفوذ بافتی مناسب، پاکسازی سریع از خون و ایمنوژنیسیتی (immunogenicity) محدود، این آنتی بادی ها کاربرد های متنوعی دارند که در زیر به تعدادی از آنها اشاره می شود.

۱- تعیین نقش پروتئین های شناخته شده جدید

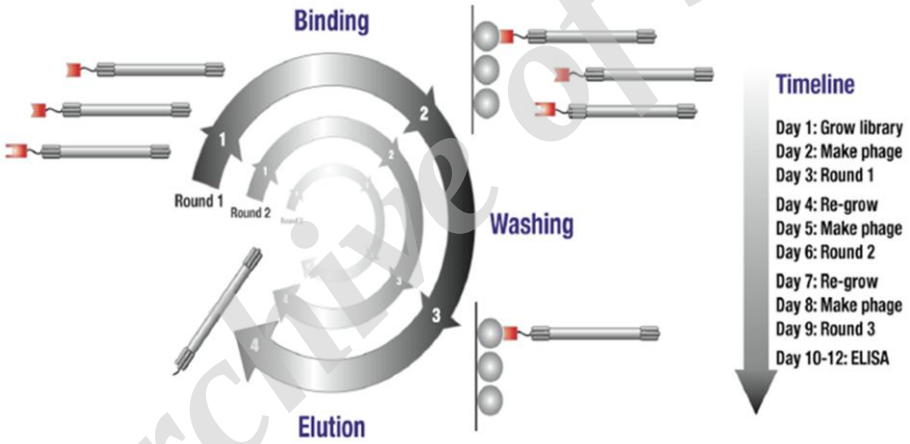
یکی از چالش های بزرگ زیست شناسی در محدوده پس ژنومی (post genomic)، دستیابی به روش های معمول برای تعیین عملکرد پروتئین-های شناسایی شده جدید است. این روش ها باید به گونه ای باشند که بتوان آن ها را در مقیاس وسیع (large scale) استفاده کرد. یکی از این روش ها بیان آنتی بادی نوترکیب درون سلولی علیه پروتئین 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 Xeuopus Laevis بررسی کردند (۴۰). با بیان scFv علیه ALK3 بصورت درون سلولی و

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017



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 پیلی F باکتری حفظ کرده است (۲۸).



تصویر ۵ مراحل غربالگری تکنیک نمایش فاژی (۳۲).

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 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 منوکلونال واکنش دهنده با اسپرم است. S19 یک آنتی بادی منوکلونال IgG1k موشی است که اپی‌توپ

www.SID.ir
Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

اختصاصی روی آنتی ژن ۱ آگلوتیناسیون اسپرم (SAGA-1) را شناسایی می کند. این آنتی ژن یک گلیکوپروتئین به شدت اسیدی است که در همه اسپرم های انسانی انزال شده وجود دارد. با توجه به مزایای scFv نسبت به آنتی بادی منوکلونال کامل، E.J.Norton و همکاران RASA scFv را از روی S19 طراحی کردند. این scFv باعث تجمع اسپرماتوزوآها بصورت سر به سر، سر به دم و دم به دم شده و از رخدادهای باروری مثل نفوذ در موکوس گردنه رحم و واکنش اسپرم و تخمک جلوگیری نموده است (۴۳).

۳- درمان بیماری ها

درمان سرطان: آنتی بادی های منوکلونال می توانند مارکر های اختصاصی موجود در سطح سلول های تومری را شناسایی کنند. به هر حال استفاده آن ها در تومرهای جامد به دلیل توانایی نفوذ بافتی کم، محدود است (۴۴). قطعات scFv به دلیل نفوذ بافتی بهتر برای این امر مناسب بوده و به راحتی وارد تومر می شوند. اما پاکسازی سریع از خون به دلیل اندازه کوچک این قطعات از معایب آن هاست. از راه های افزایش اندازه scFv ها مانند همراه (conjugate) کردن آن ها با پلی اتیلن گلیکول و نیز دایمریزاسیون آن ها با وارد کردن سیستئین های C ترمینال به منظور تشکیل scFv های مولتی مر (دیا بادی kDa ۶۰ تریا بادی kDa ۹۰ و ترابادی kDa ۱۲۰) آنها ایجاد شده است. این کار میل ترکیبی را نیز بالا می برد. به هر حال، افزایش اندازه باعث کاهش پاکسازی از خون نیز شده و این کار بر نفوذ بافتی نیز تاثیر می گذارد. بنابراین این دو مشخصه باید برای درمان موثر تومر در تعادل باشد. با توجه به این موضوع، دیا بادی ها یا آنتی بادی هایی با وزن مولکولی kDa ۱۰۰-۶۰ برای هدف قرار دادن تومر مناسب هستند (۴۵).

مطالعات بسیار زیادی در زمینه درمان سرطان با scFv ها انجام شده است (جدول ۱). یکی از راه های درمان، ممانعت از عملکرد آنتی ژن های سرطانی است. erbB یکی از این آنتی ژن هاست که در بسیاری از سلول های تومری از جمله سرطان تخمدان به مقدار زیاد بیان می شود (۴۶). Arafat و همکاران از یک مدل موشی گزنوگرافت (Xenograft) با رده سلولی سرطان تخمدان انسانی برای مطالعه اثر scFv علیه erbB استفاده کردند. با انتقال cDNA این scFv توسط حامل آدنوویروسی، غلظت scFv در بافت مورد نظر افزایش یافته و از رشد تومر جلوگیری نمود (۴۷). علاوه بر ممانعت از عملکرد آنتی ژن های سرطانی از scFv ها همچنین برای انتقال توکسین ها، داروها، رادیو نوکلئوتید ها و ... می توان استفاده کرد. Bart و همکاران از یک scFv علیه CD30 برای انتقال اگزوتوکسین سودوموناس به تومرهای هاجکین منتشر در موش مبتلا به نقص ایمنی حاد (Severe Combined Immunodeficiency) SCID استفاده کردند. با تزریق روزانه ۴۰ میکروگرم از این ایمنوتوکسین پس از ۲۰۰ روز ۹۰درصد موش های مبتلا درمان شدند (۴۸). در یک مطالعه دیگر نیز از scFv علیه نشانگر تومری midkine برای انتقال داروی ضد سرطان Doxorubicin استفاده شد که کاهش رشد توموری را در موش های مبتلا نتیجه داد (۴۹).

بیماری های پریونی: بیماری پریون یک بیماری تخریب کننده نورونی

آنتی ژن سرطانی	نوع کاربرد scFv	محققان

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

کشنده است که هیچ درمان موثری ندارد. عامل این بیماری پروتئین های عفونی هستند. پروتئین پریون اسکراپی(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 اسکراپی، 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 منینگوانسفالیتیس 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 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 بادیهای 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 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 رادیونوکلئوتید ها، کوانتوم دات ها (quantum dot)، نانو ذرات

نوع آنتی ژن	روش تهیه scFv	محققان

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

(Nanoparticle) و غیره را امکان پذیر می کند (۶۱، ۶۲). بنابراین scFvها ابزار غیر تهاجمی 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 کوانتوم 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 کارسینوامبریونیک 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 نتیجه‌گیری:

طی دو دهه ی گذشته پیشرفت ها در زمینه های مهندسی ژنتیک و پروتئین و نیز پیدایش ابزارهای قدرتمند بیوانفورماتیکی، منجر به ظهور 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 منوکلونال کامل است اما اندازه آن حدود یک سوم کاهش یافته است. این کاهش اندازه منجر به نفوذ پذیری بهتر آن به درون تومر، کاهش ایمونوژنسیتی 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 منوکلونال 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 منوکلونال 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 آن‌ها بشمار می رود، استفاده شود.

منابع:

1. Kabat EA. The structural basis for antibody complementary. Advances in protein chemistry 1978; 32: 1-75.
2. Polonelli L, Pontón J, Elguezabal 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.
3. 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.
4. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256(5517): 495-497.
5. Sgro C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD۳/orthoclone OKT۳: bibliographic review. Toxicology 1995; 105(1): 23-29.
6. Ansar W, Ghosh S. Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research. Indian Journal of Clinical Medicine 2013; (4).
7. Li F, Vijayasankaran N, Shen A, Kiss R, Amanullah A, editors. Cell culture processes for monoclonal antibody production. MAbs; 2010: Taylor & Francis.
8. 0DJRQ 0RRUHKRXVH ' :LERG\ 5RO UXK´ Current medicinal chemistry 2007; 14(18): 1978-1987.
9. Newman R, Alberts J, Anderson D, Carner K, Heard & 1RUWRQ) HW DO 3ULPDWL]DWLRQ´RI UHFRPELQDQW antibodies for immunotherapy of human diseases: a macaque/human chimeric antibody against human CD4. Nature biotechnology 1992; 10(11): 1455-1460.
10. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. Journal of Immunology Research 2012; 2012.
11. Nelson AL, editor Antibody fragments: hope and hype. MAbs; 2010: Taylor & Francis.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

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. Akadémiai 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< i> Escherichia coli</i>: 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, Pedroso I, Bell H, Falcón V, et al. High cytoplasmic expression in< i> E. coli</i>, 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. &QR\3- HDUW\GHRQUG 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 ١٣for 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:

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

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- ۲in 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)±(7$D 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 PLK۱-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 ۲single-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 MG۷-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 ۲ImmunoRNase 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. Cattepoel S, Hanenberg M, Kulic L, Nitsch RM. Chronic intranasal treatment with an anti-$ 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 xue bao= Acta pharmaceutica Sinica 2012; 47(10): 1329-1335.
60. Oelschlaeger P, Srikant-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±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

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 9:42 +0330 on Monday November 13th 2017

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, Fourozandeh M, Rasaee 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. 5DR L.-DUXHUDH12HG53DQUL3 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.

Archive of SID

www.SID.ir