

Phage display technology and development of its application in the preparation of antivenoms and other biological products

Reza Yekani¹, Maedeh Samianifard^{2,3}, Ali Nazari^{3*}

1-Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Modern Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Unit, Tehran, Iran.

2- Department of Phytochemistry, Research Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran

3- purification Laboratory, Research and Development Management, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Abstract:

Phage display technology is an advanced method in biotechnology that enables the identification and selection of target molecules through the display of peptides or proteins on the surface of bacteriophages. This technology plays a pivotal role in various biological fields, including protein engineering, drug discovery, diagnostic tool development, and the design of advanced therapies. One of its significant applications is in the production of effective antitoxins, offering an efficient alternative to traditional methods by identifying and neutralizing antibodies against toxins. Additionally, in cancer research, phage display has opened new avenues for the development of targeted and personalized therapies by identifying specific ligands and antibodies. This technology has made remarkable contributions to improving antibody-based therapies, targeted drug delivery systems, and precise disease diagnosis, enabling reduced side effects and enhanced efficiency. Other achievements include aiding in the identification of protein epitopes, the development of recombinant vaccines, and the screening of biological molecules. Comprehensive studies reveal that phage display, as a powerful tool, has significantly advanced biological and medical sciences. Its integration with technologies like artificial intelligence holds the potential for even greater breakthroughs. Given the versatility and efficiency of this method, phage display is expected to be increasingly utilized in emerging fields such as the treatment of chronic and infectious diseases, driving transformative progress in biological and medical research.

Keywords: Phage Display, Protein Engineering, Drug Discovery, Targeted Therapies, Neutralizing Antibodies, Disease Diagnosis, Recombinant Vaccines.

Corresponding author:

purification Laboratory, Research and Development Management, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Email: anshirvan@gmail.com

فناوری نمایش فاژی و توسعه کاربرد آن در تهیه پادزهرها و دیگر فراورده های بیولوژیک

رضا یکانی^۱، مائده سمیعانی فرد^{۲،۳}، علی نظری^{۳*}

- ۱- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
- ۲- گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران.
- ۳- بخش تحقیق و توسعه موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

چکیده

فناوری نمایش فاژ یک روش پیشرفته در زیست فناوری است که با استفاده از نمایش پپتیدها یا پروتئین ها بر سطح باکتریوفاژها، امکان شناسایی و انتخاب مولکول های هدف را فراهم می کند. این فناوری نقش کلیدی در حوزه های مختلف زیستی مانند مهندسی پروتئین، کشف دارو، توسعه ابزارهای تشخیصی و طراحی درمان های پیشرفته ایفا می کند. یکی از کاربردهای مهم این فناوری در تولید پادزهرهای مؤثر است که با شناسایی آنتی بادی های خنثی کننده سموم، جایگزینی کارآمد برای روش های سنتی ارائه می دهد. همچنین، در پژوهش های سرطان، نمایش فاژ با شناسایی لیگاندها و آنتی بادی های اختصاصی، مسیر جدیدی برای توسعه درمان های هدفمند و شخصی سازی شده گشوده است. این فناوری در بهبود درمان های مبتنی بر آنتی بادی، سیستم های دارورسانی هدفمند، و تشخیص دقیق بیماری ها، نقش چشمگیری داشته و امکان کاهش عوارض جانبی و افزایش کارایی را فراهم کرده است. از دیگر دستاوردهای این فناوری می توان به کمک در شناسایی اپی توپ های پروتئینی، توسعه واکسن های نو ترکیب، و غربالگری مولکول های زیستی اشاره نمود. بررسی های جامع نشان می دهند که نمایش فاژ، به عنوان ابزاری توانمند، در پیشرفت علوم زیستی و پزشکی سهم بسزایی دارد و قابلیت ادغام با فناوری های نظیر هوش مصنوعی می تواند زمینه ساز دستاوردهای بیشتر شود. با توجه به تنوع و کارایی این روش، انتظار می رود نمایش فاژ در آینده به طور گسترده تری در حوزه های نوظهوری مانند درمان بیماری های مزمن و عفونی استفاده شود و تحولاتی اساسی در پژوهش های زیستی و پزشکی ایجاد کند.

واژگان کلیدی: نمایش فاژ، زیست فناوری، مهندسی پروتئین، کشف دارو، درمان های هدفمند، آنتی بادی های خنثی کننده، تشخیص بیماری، واکسن های نو ترکیب.

نویسنده مسئول: بخش تحقیق و توسعه موسسه تحقیقات واکسن

و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

پست الکترونیکی: anshirvan@gmail.com

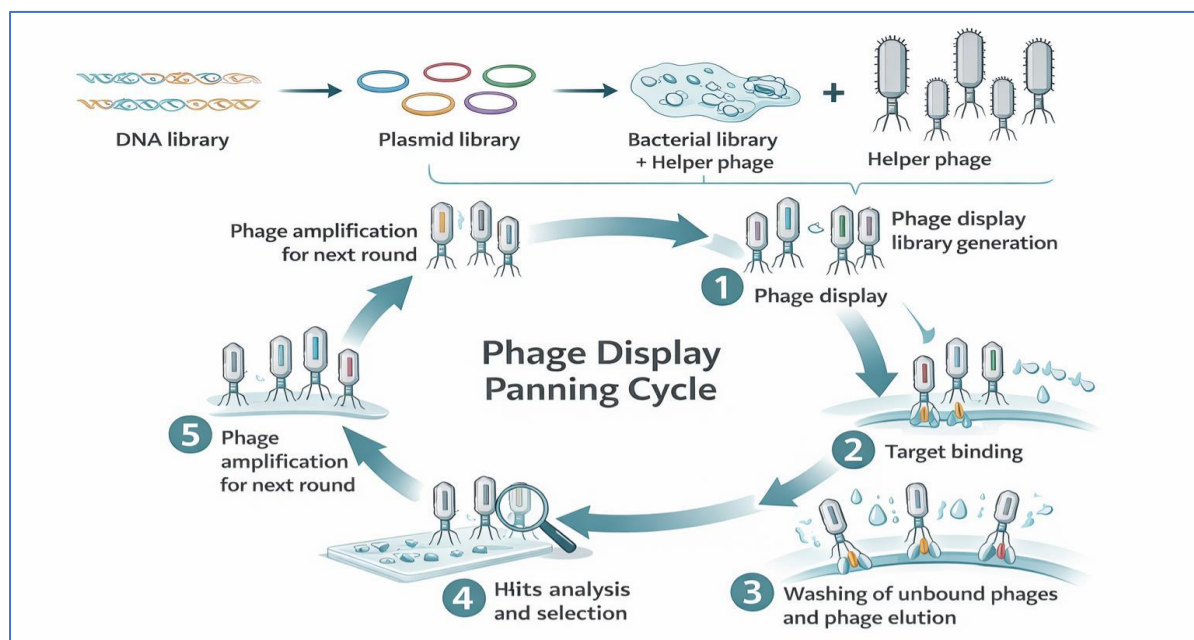
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱

۱- مقدمه

طیف وسیعی از توالی‌های پپتیدی و پروتئینی استفاده می‌کنند تا مولکول‌های موردنظر خود را شناسایی کنند [۱]. خلاصه‌ای از مطالعه‌های انجام‌شده در این زمینه در جدول ۱ ارائه شده و نتایج این پژوهش‌ها به تفصیل موردبحث قرار گرفته است. این فناوری برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط George P. Smith معرفی شد و به دلیل تأثیر عمیق آن در پیشرفت علوم زیستی، جایزه نوبل شیمی در سال ۲۰۱۸ به وی اعطا شد [۲]. یکی از تکنیک‌های اصلی مرتبط با نمایش فاز، بیوپنینگ^۵ است که یک فرایند چندمرحله‌ای برای انتخاب و غربالگری مولکول‌هایی با تعامل قوی نسبت به اهداف زیستی محسوب می‌شود. این فرایند معمولاً در پنج مرحله انجام می‌گیرد و طی آن پپتیدها یا آنتی‌بادی‌های دارای ویژگی‌های زیستی مطلوب شناسایی و به صورت تدریجی غنی‌سازی می‌شوند (شکل ۱) [۳].

فناوری نمایش فاز^۱ یکی از پیشرفته‌ترین و پرکاربردترین ابزارها در زیست‌فناوری و زیست‌شناسی مولکولی به‌شمار می‌رود. این تکنیک امکان شناسایی و انتخاب دقیق پپتیدها^۲ یا پروتئین‌هایی با ویژگی‌های خاص را از کتابخانه‌های فازهای^۳ اصلاح‌شده ژنتیکی فراهم می‌کند. فازها، ویروس‌هایی هستند که باکتری‌ها را آلوده می‌کنند، به‌عنوان حامل‌هایی برای نمایش مولکول‌های هدف روی سطح خارجی خود عمل می‌کنند. این ویژگی، آن‌ها را به ابزاری قدرتمند برای پژوهش‌های زیستی تبدیل کرده است. قابلیت تنوع و انعطاف‌پذیری بالای این فناوری، آن را به یک روش کلیدی در حوزه‌هایی مانند مهندسی پروتئین، کشف دارو، توسعه آنتی‌بادی‌های درمانی، تولید واکسن و شناسایی لیگاند^۴های پپتیدی برای گیرنده‌ها و آنزیم‌ها تبدیل کرده است. پژوهشگران از این روش برای بررسی



شکل ۱- چرخه پنینگ نمایش فاز برای انتخاب لیگاندها. نمای شماتیک از فرایند نمایش فاز که در آن کتابخانه نمایش فاز از کتابخانه DNA از طریق ساخت پلاسمید و انتقال به باکتری در حضور فاز کمکی تولید می‌شود. چرخه پنینگ شامل پنج مرحله اصلی است: (۱) تولید کتابخانه نمایش فاز، (۲) اتصال لیگاندهای نمایش داده‌شده به هدف تثبیت‌شده، (۳) شست‌وشوی فازهای متصل‌نشده و واجذب فازهای متصل، (۴) تحلیل و انتخاب کلون‌های غنی‌شده و (۵) تکثیر فازهای انتخاب‌شده برای دورهای بعدی پنینگ. تکرار این چرخه موجب غنی‌سازی لیگاندهای با میل اتصال بالا و اختصاصیت بیشتر نسبت به هدف می‌شود [۲].

کتابخانه‌های DNA با تنوع بسیار بالا، از طریق ناقل‌های پلاسمیدی و در حضور فاز کمکی ایجاد می‌گردد. این

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، فرایند نمایش فاز با تولید کتابخانه نمایش فاز آغاز می‌شود که از

⁴ Ligand

⁵ Biopanning

¹ Phage Display Technology

² Peptide

³ Phage

Google Scholar انجام شد. در مجموع ۹۵ مقاله مرتبط با فناوری نمایش فاژ بررسی گردید. واژگان کلیدی مورد استفاده شامل: “Antibody, Phage Display”, “Peptide”, “Therapeutic Antibodies”, “Discovery”, “Drug Development”, “Library” بودند. مقاله‌های انتخاب شده مربوط به بازه زمانی ۱۹۸۵ تا ۲۰۲۳ بوده و شامل تحقیق‌های اصلی، مرورهای سیستماتیک و مطالعه‌های کاربردی در زمینه توسعه آنتی‌بادی، واکسن و پادزهر بودند.

۱-۲- کتابخانه نمایش فاژی

کتابخانه‌های نمایش فاژ ابزار قدرتمندی هستند که در بیولوژی مولکولی و بیوشیمی برای مطالعه برهم‌کنش‌های پروتئین-لیگاند در زمینه مهندسی پروتئین و کشف آنتی‌بادی استفاده می‌شوند. این کتابخانه‌ها شامل باکتریوفاژهایی هستند که پپتیدها یا قطعه‌های پروتئینی را بر سطح خود نمایش می‌دهند و امکان شناسایی مولکول‌هایی با اتصال اختصاصی به اهداف زیستی را فراهم می‌کنند. این روش در مهندسی پروتئین، کشف دارو، توسعه واکسن و مطالعه تعامل‌های مولکولی کاربرد وسیعی دارد [۶]. این کتابخانه‌ها قابلیت غربالگری برای اهداف مختلف از جمله پروتئین‌ها، پپتیدها، مولکول‌های کوچک و حتی اهداف پیچیده سلولی را دارند. نوع‌های مختلفی از کتابخانه‌های نمایش فاژ وجود دارند که شامل کتابخانه‌های پپتیدی تصادفی، پپتید محدود و کتابخانه‌های آنتی‌بادی هستند که برای کاربردهای مختلف قابل استفاده هستند [۷]. ساخت یک کتابخانه نمایش فاژ شامل مراحل زیر است:

۱- تولید یک کتابخانه DNA: ایجاد یک مجموعه متنوع از قطعه‌های DNA که پپتیدها یا پروتئین‌های تصادفی را کُد می‌کند؛ که می‌توان با تصادفی‌سازی مناطق خاصی از توالی DNA یا با استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای مصنوعی با کدون‌های منقط به دست آورد [۸].

۳- بسته‌بندی و عفونت: ناقل فاژ حامل کتابخانه DNA از طریق فرایندی به نام الکتروپوراسیون^۲ به باکتری میزبان (معمولاً *Escherichia coli*) وارد می‌شود. باکتری‌های آلوده ذرات فاژ را تولید می‌کنند که پروتئین‌ها/پپتیدهای گذگاری شده را روی سطح خود نشان می‌دهند [۱۰].

کتابخانه‌ها شامل میلیون‌ها تا میلیارد‌ها توالی مختلف هستند که پروتئین‌ها یا پپتیدهای تصادفی را بر سطح فاژ نمایش می‌دهند. در مرحله نخست، ذرات فاژ حامل این لیگاند‌های متنوع تولید می‌شوند. در مرحله دوم، فاژها با هدف زیستی تثبیت شده انکوبه شده و لیگاند‌های دارای میل اتصال مناسب به هدف متصل می‌شوند. در مرحله سوم، فاژهای غیرمتصل طی مراحل شست‌وشو حذف شده و فاژهای متصل به‌طور انتخابی واجذب می‌گردند. در مرحله چهارم، کلون‌های غنی شده موردتحلیل و انتخاب قرار می‌گیرند و در نهایت، در مرحله پنجم، فاژهای منتخب تکثیر شده و برای دورهای بعدی پنینگ مورد استفاده قرار می‌گیرند. تکرار این چرخه منجر به غنی‌سازی تدریجی لیگاند‌هایی با میل اتصال و اختصاصیت بالاتر نسبت به هدف می‌شود [۲، ۴].

فناوری نمایش فاژ کاربردهای گسترده‌ای در حوزه‌های مختلف زیست‌فناوری و پزشکی دارد. این روش نه تنها در مهندسی پروتئین و کشف دارو نقش مهمی ایفا می‌کند، بلکه در توسعه آنتی‌بادی‌های درمانی، شناسایی اپی‌توپ‌ها و مطالعه تعامل‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی نیز بسیار مؤثر است. یکی از کاربردهای برجسته این فناوری، تولید پادزهر برای درمان مسمومیت‌های ناشی از سموم است. برخلاف روش‌های سنتی مبتنی بر استفاده از حیوانات آزمایشگاهی که با چالش‌هایی مانند هزینه بالا و مسائل ایمنی همراه هستند، نمایش فاژ امکان شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه سموم را فراهم کرده و به بهینه‌سازی و ایمن‌سازی این فرایندها کمک می‌کند [۵].

علاوه بر این، نمایش فاژ در پژوهش‌های سرطان نیز اهمیت زیادی دارد. این فناوری برای شناسایی اهداف توموری و طراحی درمان‌های هدفمند، شامل داروهای اختصاصی تومور و مداخله‌های ایمنی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در نهایت، نمایش فاژ به عنوان ابزاری نوآورانه در توسعه درمان‌های شخصی‌سازی شده سرطان و سایر حوزه‌های زیست‌شناسی و پزشکی، نقش بی‌بدیلی ایفا می‌کند.

۲- مواد و روش‌ها

برای تهیه این مرور سیستماتیک، جست‌وجو در پایگاه‌های داده علمی شامل PubMed، Scopus، Web of Science و

² Electroporation

¹ Bacteriophage

کتابخانه‌های بکر از یک منبع طبیعی، مانند سلول‌های B اولیه اهداکنندگان غیرایمن شده تقویت می‌شوند. ژن‌های ناحیه متغیر برای ساخت مجموعه‌های بزرگ^{۱۱} تا ۱۰ عضو استفاده شده‌اند. کتابخانه‌ها برای تولید آنتی‌بادی‌ها در مقابل آنتی‌ژن‌های متنوع، از جمله سموم و آنتی‌ژن‌های خود، مورد استفاده قرار می‌گیرند (شکل ۲). یکی از این کتابخانه‌ها به نام CAT1.0^۶ است که ابتدا به صورت کتابخانه بزرگ نمایش فاژ آنتی‌بادی ساده طراحی شده است [۲۰].

۲-۲-۲- کتابخانه‌های ایمن^۷

کتابخانه‌های ایمن از مجموعه آنتی‌بادی مشتق شده از سلول B از اهداکنندگان ایمن شده تولید می‌شوند و دارای پائل محدودی از آنتی‌ژن‌ها هستند. به این دلیل، اندازه آن‌ها به طور معمول نسبتاً کوچک است (شکل ۲). با این حال برخلاف کتابخانه‌های بکر، کتابخانه‌های ایمن برای تعیین قطعه‌های آنتی‌بادی که طیف وسیعی از آنتی‌ژن‌ها را هدف قرار می‌دهند، به ویژه خود آنتی‌ژن‌ها نامناسب هستند [۲۱].

۲-۲-۳- کتابخانه‌های نیمه سنتزی^۸

کتابخانه‌های نیمه سنتزی شامل هر دو CDR از منابع طبیعی و همچنین در طراحی سیلیکونی قطعه‌های تعریف شده است. اولین کتابخانه‌های نیمه سنتزی از انواع ژن‌های چارچوب مختلف برای بالا نگه داشتن تنوع استفاده کردند. در سال ۱۹۹۲ Hogenboom & Winter کتابخانه‌های نیمه سنتزی نمایش فاژ آنتی‌بادی^۹ scFv را توصیف کردند که شامل ۴۹ توالی VH خط سنگین و یک زنجیره سبک V_{lambda}3 بود (شکل ۲) [۲۲].

۲-۲-۴- کتابخانه‌های سنتزی^{۱۰}

کتابخانه‌های سنتزی مبتنی بر محاسبات در طراحی سیلیکو^{۱۱} و سنتز ژن هستند. طراحی و ترکیب CDR دقیقاً تعریف و کنترل شده است.^{۱۲} HuCAL (کتابخانه آنتی‌بادی ترکیبی انسانی) یک کتابخانه سنتزی از آنتی‌بادی‌های^{۱۳} Fab انسانی با اندازه ۴/۵×۱۰^{۱۰} است (این عدد به معنای اندازه کتابخانه

۴- انتخاب و غربالگری: کتابخانه نمایش فاژ تحت چندین دور انتخاب قرار می‌گیرد تا فاژهایی که به یک هدف خاص مورد علاقه متصل می‌شوند غنی شود. این هدف به طور معمول با استفاده از روشی به نام بایوپنینگ انجام می‌شود، که در آن جمع‌آوری اطلاعات تحت نظر مولکول مورد نظر قرار می‌گیرد، که بر روی یک پایه پایدار بی حرکت است [۱۱].

۵- تقویت و بازیابی: فاژه‌های انتخاب شده از تکیه‌گاه جامد بازیابی می‌شوند و برای آلوده کردن باکتری‌ها برای تکثیر استفاده می‌شوند. این فرایند برای دوره‌های متعدد تکرار می‌شود تا غنی‌سازی فاژه‌های اتصال هدف افزایش یابد [۱۲].

۲-۲- کتابخانه‌های آنتی‌بادی فاژ

کتابخانه‌های آنتی‌بادی فاژی، مجموعه‌هایی از باکتریوفاژهای مهندسی شده هستند که توالی‌های آنتی‌بادی‌های مختلف را روی سطح خود نشان می‌دهند. در تحقیق‌های جدید، از فاژ به عنوان جایگزینی برای فناوری هیبریدوم^۱ در جداسازی آنتی‌بادی‌های مختلف استفاده می‌شود. این فرایند شامل ایجاد کتابخانه‌های ترکیبی از ژن‌های دامنه متغیر زنجیره سنگین (VH^۲) و دامنه متغیر زنجیره سبک (VL^۳) است که بر روی سطح فاژ بیان می‌شوند [۱۳]. محل اتصال آنتی‌ژن در یک آنتی‌بادی شامل شش ناحیه تعیین کننده مکمل (CDRs^۴) است که سه ناحیه در هر حوزه V زنجیره‌های سبک و سنگین وجود دارد [۱۴-۱۶]. به طور مشابه، شبیه‌سازی ژن‌های VL و VH که توسط یک ژن پپتید پیوندی انعطاف پذیر متصل شده‌اند، منجر به تولید scFv می‌شود که با پروتئین پوششی فاژ ترکیب می‌گردد [۱۷-۱۹]. با توجه به منبع توالی‌های کتابخانه‌ای، کتابخانه‌های آنتی‌بادی نمایش فاژ به چهار دسته اصلی شامل کتابخانه‌های بکر، ایمنی، نیمه سنتتیک و سنتتیک تقسیم می‌شوند که نمای شماتیک و تفاوت‌های مفهومی آن‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است.

۲-۲-۱- کتابخانه‌های بکر^۵

⁸ Semi-Synthetic Libraries

⁹ Single-Chain Variable Fragments

¹⁰ Synthetic Libraries

¹¹ In Silico Design

¹² Human Combinatorial Antibody Library

¹³ Fragment Antigen-Binding

¹ Hybridum

² Variable Heavy Chain

³ Variable Light Chain

⁴ Complementarity Determining Regions

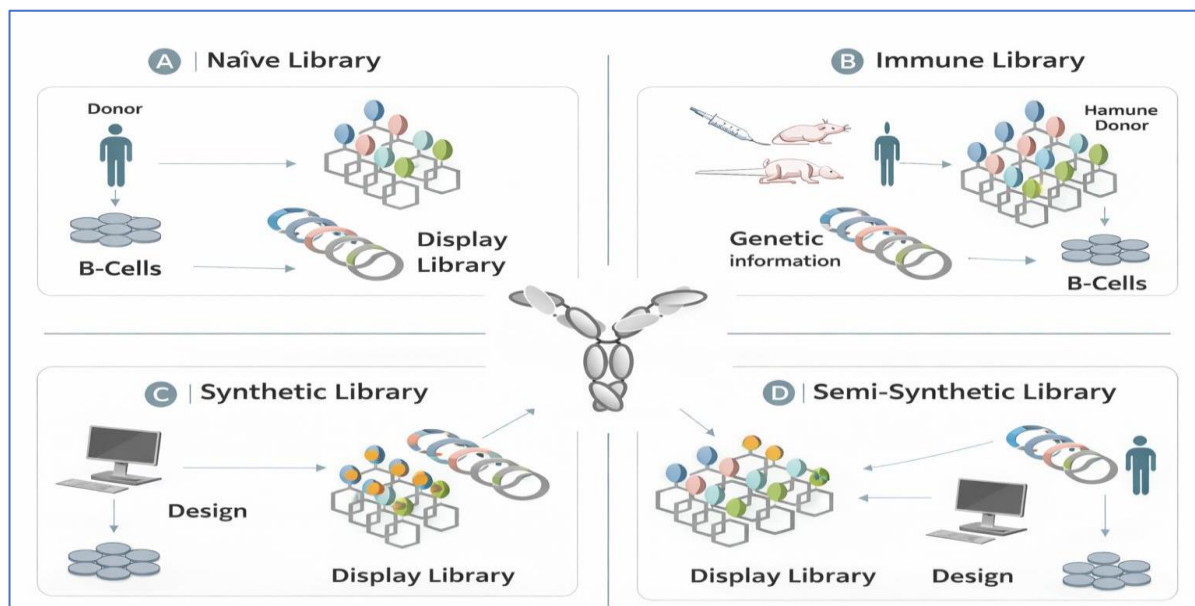
⁵ Naive

⁶ Cambridge Antibody Technology

⁷ Immune Libraries

کتابخانه است. یعنی هر آنتی بادی دارای تنوعی معادل $10^{10} \times 4/5$ توالی متفاوت CDR می باشد، بنابراین به تنوع بالای این کتابخانه سنتزی نیز اشاره شده است [۲۳].

HuCAL می باشد (شکل ۲). رقم « 10^{10} » به معنای تعداد آنتی بادی های مختلف در این کتابخانه است. عدد « $4/5$ » نشان دهنده تنوع داخل هر آنتی بادی Fab به کار رفته در این



شکل ۲- انواع کتابخانه های نمایش فاژ آنتی بادی. نمای شماتیک از چهار نوع کتابخانه نمایش فاژ شامل: (A) کتابخانه طبیعی که از سلول های B افراد غیرایمن شده به دست می آید، (B) کتابخانه ایمنی حاصل از سلول های B اهداکنندگان یا حیوانات ایمن شده در مقابل آنتی ژن خاص، (C) کتابخانه سنتتیک مبتنی بر طراحی درون محاسباتی توالی های آنتی بادی و (D) کتابخانه نیمه سنتتیک که ترکیبی از چارچوب های طبیعی و نواحی متغیر طراحی شده را شامل می شود [۲۱، ۲۲].

۲-۳- کتابخانه فاژی پپتید^۱

کتابخانه های پپتید فاژ ابزارهای قدرتمندی هستند که برای شناسایی توالی های پپتیدی متصل به یک مولکول هدف استفاده می شوند. این کتابخانه ها شامل باکتریوفاژهای مهندسی شده با توالی های پپتیدی مختلف هستند و با غربالگری، پپتیدهای متصل به هدف را شناسایی می کنند. این ابزارها در کشف دارو، توسعه واکسن ها و مطالعه برهم کنش های پروتئین-پروتئین مورد استفاده قرار می گیرند. کتابخانه های پپتید فاژ به دو نوع خطی و حلقوی تقسیم می شوند و از باکتریوفاژهای مهندسی شده با توالی های پپتیدی منحصر به فرد تشکیل می شوند. استفاده از این کتابخانه ها در شناسایی پپتیدهای متصل به گیرنده های مولکولی خاص به منظور کشف دارو یا توسعه واکسن ها بسیار مفید است. سیستم نمایش فاژ M13 به عنوان یکی از کتابخانه های پپتید فاژ، می تواند توالی های پپتیدی مختلف

را نشان داده و با ترکیبی که به هدف مورد نظر متصل می شود، مطالعه و غربالگری انجام دهد [۲۴، ۲۵].

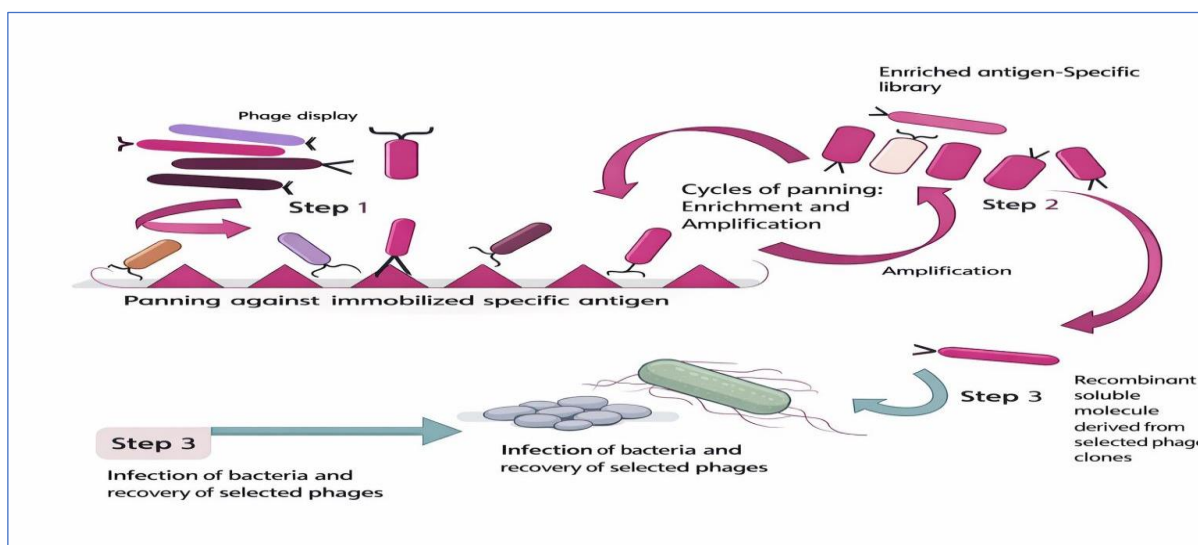
۲-۴- کاربردهای نمایش فاژی

فناوری نمایش فاژ، در تولید مواد ضدزهر مورد استفاده قرار می گیرد که نقش مهمی در درمان نیش حیوانات سمی ایفا می کند. استفاده از تکنیک نمایش فاژ شامل ساخت کتابخانه ای از فاژهای مختلف است که هرکدام یک پپتید یا پروتئین منحصر به فرد را روی سطح خود نمایش می دهند. با قرار دادن کتابخانه فاژ در معرض سم، فاژها، پپتیدها یا پروتئین هایی را نشان می دهند که می توانند به اجزای سم متصل شوند، یا زنده می مانند و می توانند جدا شوند. پس از جداسازی، پپتیدها یا پروتئین های نمایش داده شده روی فاژ را می توان بیشتر مشخص کرد. در این فناوری، فاژ به عنوان وکتور بیانی استفاده می شود که قابلیت ارائه توالی های آمینواسیدی خارجی برای اتصال به آنتی بادی را دارد. جنبه اساسی فناوری نمایش فاژ ارتباط ژنوتیپ

¹ Phage Peptide Library

مانند واکنش‌های تب‌زایی ناشی از اندوتوکسین‌ها^۴ و واکنش‌های غیر IgE^۵ طبقه‌بندی شوند. واکنش‌های دیررس ممکن است بین ۵ تا ۲۴ روز پس از تجویز پادزهر رخ دهند و توسط کمپلکس‌های ایمنی ایجاد شده توسط ایمونوگلوبولین‌های بیمار مقابل آنتی‌بادی‌های هترولوگ^۶ یا پروتئین‌های زهر ایجاد می‌شوند. این واکنش‌ها به‌عنوان بیماری‌سرمی شناخته می‌شوند که نشانه‌هایی مانند تب، میالژی^۷، آرترالژی^۸، آرتریت^۹، کهیر و اختلالات گوارشی را ایجاد می‌کنند. برای کاهش این اثرها، از آنتی‌بادی‌های کایمربیک^{۱۰} با ایمونوگلوبولین^{۱۱} منشا انسانی استفاده می‌شود. فناوری نمایش فاز توسط محققان توسعه داده شده و پپتیدها و یا دامنه‌های ایمونوگلوبولین را بر روی سطح فازهای رشته‌ای ارائه می‌دهد (شکل ۳) [۲۸-۳۰]. این تکنیک به کاهش اثرهای ناشی از پادزهرها و امکان تولید آنتی‌بادی‌های خاص به‌طور انحصاری کمک می‌کند. همچنین، استفاده از روش‌های پروتئومیک^{۱۲} نیز به تشخیص و انتخاب مولکول‌های مفیدتر جهت تولید آنتی‌بادی‌های مؤثرتر در مقابل سموم حیوانی کمک می‌کند [۳۱-۳۳].

با فنوتیپ است، که امکان غنی‌سازی فازهای خاص را فراهم می‌کند. فازهایی که توانایی نمایش لیگاند مرتبط را دارند در نتیجه نگهداری می‌شوند، درحالی‌که فازهای غیرمتصل شسته می‌شوند. فازهای نگهداری شده به باکتری‌ها تزریق می‌شوند و برای غنی کردن کلون‌های بازایی شده از کتابخانه تکثیر می‌شوند. سیستم‌های مختلفی مانند سیستم‌های فاز T4^۱، لامبدا^۲ و M13^۳ برای ساخت کتابخانه فاز استفاده می‌شوند. فاز M13 که در سم‌شناسی نیز پژوهش‌های زیادی انجام شده است، به‌عنوان وکتور اصلی استفاده می‌شود. برای ایجاد یک کتابخانه، باکتریوفاز M13 به‌کار می‌رود و قطعاتی از آنتی‌بادی‌ها روی پروتئین پوششی pIII فاز M13 نمایش داده می‌شوند، درحالی‌که ژن رمزگذاری قطعات آنتی‌بادی در DNA فاز جای می‌گیرد [۲۶، ۲۷]. دستورالعمل‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO) برای تولید و کنترل ایمونوگلوبولین‌های ضد زهر مار، اثرهای ناخواسته پادزهرها را به دو دسته واکنش‌های زودرس و دیررس تقسیم می‌کند. واکنش‌های زودرس ممکن است در ۲۴ ساعت اول تجویز پادزهر ظاهر شوند و می‌توانند براساس مکانیسم‌هایی



شکل ۳- فرایند انتخاب و غنی‌سازی فازهای اختصاصی در فناوری نمایش فاز. نمای شماتیک از مراحل اصلی نمایش فاز شامل: (مرحله ۱) انکوباسیون کتابخانه نمایش فاز با آنتی‌ژن اختصاصی تثبیت شده و انتخاب اولیه فازهای متصل، (مرحله ۲) تکرار مراحل انتخاب همراه با غنی‌سازی و تکثیر فازهای دارای میل اتصال بالاتر و (مرحله ۳) آلودگی باکتری‌ها و بازایی فازهای منتخب. درنهایت، کلون‌های انتخاب شده برای تولید مولکول نو ترکیب محلول با ویژگی اتصال اختصاصی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳۰].

⁷ Myalgia

⁸ Arthralgia

⁹ Arthritis

¹⁰ Chimeric

¹¹ Immunoglobulin

¹² Proteomics

¹ T4 Bacteriophage

² Lambda

³ M13 Bacteriophage

⁴ Endotoxin

⁵ Immunoglobulin E

⁶ Heterologous

۲۰۰۹، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال scFv را برای مهار اثرهای کشنده سم خام کروئالوس دوریسوس تریفیکوس^۳ (مار زنگی جنوب غربی) و کروئوکسین توسعه دادند. این آنتی‌بادی‌ها توانستند زمان بقای حیوانات را پس از تزریق آنتی‌ژن کروئوکسین افزایش دهند؛ زیرا آن‌ها درمقابل PLA2^۴ موجود در سم کروئوکسین مؤثر بودند [۳۵]. در مسیر توسعه Roncolato و همکاران در سال ۲۰۱۵ درمقابل سم مار بوتریس جاراراکوسو^۵، نمونه‌های فاژ scFv انسانی تولید کردند که کاهش سمیت زهر را نشان دادند [۲۶، ۴۰]. همچنین، Tamarouzi در همان سال کلون‌های فاژ-scFv با توان بازدارندگی مشابه شناسایی کرد [۴۱]. کاربردهای فناوری نمایش فاژ تنها به سم‌شناسی محدود نماند. Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۴، پپتیدهایی را شناسایی کردند که به‌طور اختصاصی به سلول‌های سرطان مری متصل می‌شوند و قابلیت استفاده به‌عنوان بیومارکر تشخیصی یا ابزار هدف‌گیری درمانی را دارند [۴۲]. شکل ۴ جدول زمانی پیشرفت‌های مرتبط با تولید قطعه‌های آنتی‌بادی با استفاده از فناوری نمایش فاژ و ارتباط آن با سموم مختلف را نمایش می‌دهد [۴۱]. Liu و همکاران در سال ۲۰۱۶، آنتی‌بادی‌های scFv متصل‌شونده به بیومارکر متابولیک PKM2 در سرطان کبد را معرفی کردند که کاربرد بالقوه‌ای در تشخیص زود هنگام و هدف‌گیری درمانی داشتند [۴۳]. در همان سال، Guo و همکاران کتابخانه فاژ ۱۲ مرحله‌ای را درمقابل سم D. Acutus^۶ طراحی کردند که توانایی محافظت حیوانات در برابر اثرهای خون‌ریزی سم را نشان داد [۴۴]. Titus و همکاران در سال ۲۰۱۷ با استفاده از این فناوری، یک مهارکننده جدید برای فعالیت PLA2 از مار آبی غربی (آگکistroدون پیسیووروس اس پی^۷) توسعه دادند و دریافتند که پپتیدهای منتخب قادر به مهار فعالیت PLA2 سم مار در محیط آزمایشگاهی هستند. همچنین، آن‌ها تأکید کردند که فاژهای M13 که پپتیدهای ۷ مرحله‌ای دایره‌ای یا ۱۲ مرحله‌ای خطی را نمایش می‌دهند می‌توانند راهکاری نوین برای تولید مواد ضدزهر ارائه کنند (شکل ۵) [۲۶]. Laustsen و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از فناوری نمایش فاژ، آنتی‌بادی‌های انسانی چندگونی درمقابل سم مار

در دهه‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰، پژوهشگران گام‌های اولیه را در توسعه فناوری نمایش فاژ برداشتند. یکی از اولین مطالعه‌های برجسته در این حوزه توسط Smith و همکاران در سال ۱۹۸۵ انجام شد که این فناوری را به‌عنوان روشی نوآورانه برای نمایش پروتئین‌ها معرفی کردند [۳۴]. جدول ۱ اطلاعات کلیدی مطالعه‌های مرتبط شامل نویسندگان، سال مطالعه، اهداف پژوهش و نتایج حاصل را خلاصه می‌کند. از زمان معرفی این فناوری در سال ۱۹۸۵، پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه‌هایی نظیر تولید آنتی‌بادی‌ها، شناسایی پپتیدها و توسعه پادزهرها انجام شده است. جست‌وجوهای انجام‌شده در پایگاه‌های PubMed و Google Scholar استفاده از کلیدواژه‌های «نمایش فاژ» و «زهر» تا تاریخ ۹ سپتامبر ۲۰۱۴ منجر به شناسایی ۳۹ مقاله تحقیقاتی شد [۳۵، ۳۶]. نخستین مطالعه در این زمینه نشان داد که آنتی‌بادی‌های مشتق‌شده از نمایش فاژ به سال ۱۹۹۵ بازمی‌گردند؛ در این سال Tim Meng و همکارانش کتابخانه‌ای از آنتی‌بادی‌های ترکیبی را از سلول‌های B طحال موش، غنی‌شده با کروئوکسین^۱ ایجاد کردند [۳۷]. در این دوره، تمرکز اصلی پژوهش‌ها بر استفاده از نمایش فاژ برای تولید ایمونوژن‌ها به‌منظور ساخت سرم‌های درمانی یا واکسن‌ها بود. برای مثال، Ghazarian و Hernandez در سال ۲۰۰۲ از میموتوپ‌های سمی برای تولید ایمونوژن‌های^۲ کارآمد استفاده کردند [۳۶]. در ادامه Ladner و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که پپتیدهای حاصل از کتابخانه‌های نمایش فاژی می‌توانند به‌عنوان جایگزین‌های بالقوه آنتی‌بادی‌ها در درمان‌های سم‌زدایی و توسعه ایمونوژن‌های اختصاصی مورد استفاده قرار گیرند. این رویکرد امکان طراحی ایمن‌تر و هدفمند پادزهرها را فراهم ساخت [۳۸]. همچنین، Cardoso و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از کتابخانه فاژ scFv انسانی، ۱۴ کلون آنتی‌بادی اختصاصی درمقابل کروئوکسین تولید کردند [۳۹]. Bradbury & Marks در سال ۲۰۰۴ با استفاده از فناوری نمایش فاژ، آنتی‌بادی‌هایی با میل ترکیبی بالا شناسایی کردند که کاربرد بالقوه در درمان‌ها داشتند. این مطالعه نقطه عطفی در بهره‌برداری درمانی از فناوری نمایش فاژ بود [۳]. Oliveira و همکاران در سال

⁵ Bothrops Jararaca Su

⁶ Deinagkistrodon Acutus

⁷ Agkistrodon Pisororus Sp

¹ Crotoxin

² Immunogen

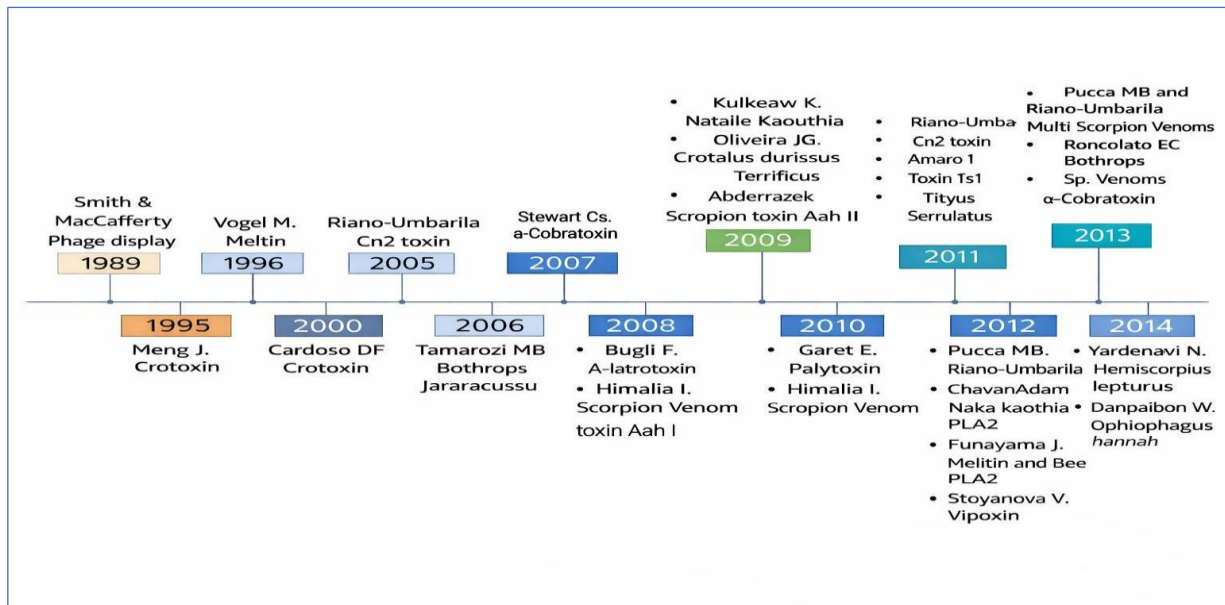
³ Crotalus Dorisus Trificus

⁴ Phospholipase A2

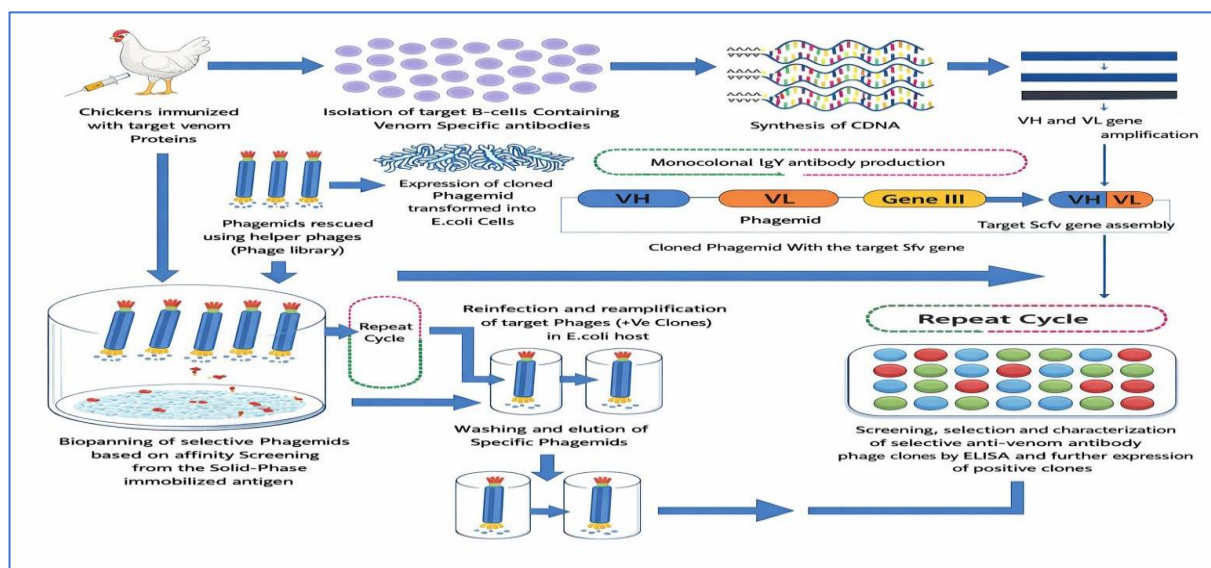
روش و پتانسیل آن برای توسعه به عنوان مولکول های درمانی جدید بود (جدول ۱) [۵۲]. تحقیق های اولیه عمدتاً بر تولید ایمونوژن ها و پادزهرهای ضدسموم متمرکز بودند و معمولاً به سموم خاصی همچون کروتوکسین پرداخته می شد. با این حال، در سال های اخیر، فناوری نمایش فاز به طور فزاینده ای در شناسایی بیومارکرهای سرطانی و تولید آنتی بادی های مونوکلونال برای مقابله با سموم حیوانات مختلف به کار گرفته شده است. به طور مشابه، Yekani و همکاران (۲۰۲۵) با بهره گیری از کتابخانه های scFv انسانی و فرایند بیوپنینگ، آنتی بادی های بازترکیب با تمایل اتصال بالا در مقابل توکسوئید گزاز جداسازی کردند که بیانگر کارایی این فناوری در توسعه ابزارهای تشخیصی و گزینه های درمانی هدفمند در مقابل توکسین های باکتریایی است. این تحول ها نشان می دهند که فناوری نمایش فاز نه تنها ابزاری مؤثر در تولید درمان های هدفمند و پادزهرهای تخصصی است، بلکه نقش مهمی در توسعه روش های تشخیصی حساس و سریع و تشخیص زودهنگام بیماری ها نیز ایفا می کند [۵۳]. به طور کلی، فناوری نمایش فاز در طول دهه ها تحولات چشمگیری را تجربه کرده است. از آغاز معرفی این فناوری به عنوان ابزاری برای نمایش پروتئین ها، اکنون به یکی از ابزارهای اساسی در شناسایی بیومارکرها، تولید پادزهرها و درمان بیماری ها تبدیل شده است. پیشرفت های اخیر در زمینه تولید آنتی بادی های مونوکلونال و پادزهرهای تخصصی، این فناوری را به ابزاری مؤثر در درمان بیماری های ناشی از سموم حیوانات و همچنین تشخیص و درمان سرطان ها بدل کرده است.

سیاه تولید کردند. نتایج نشان دادند که این پادزهرها در مدل حیوانی قادر به خنثی سازی اثرهای سمی و نجات جان حیوانات بودند و نمونه ای موفق از کاربرد نمایش فاز در تولید پادزهرهای نوین است (جدول ۱) [۴۵-۴۷]. Vanopadeth و همکاران دریافتند که با وجود مشکلات موجود در تولید سنتی پادزهرها، فناوری نمایش فاز می تواند برای تولید آنتی بادی های تک نوکلئوتیدی در مقابل سموم مار مؤثر باشد [۴۸]. همچنین، Ledesgaard و همکاران در همان سال آنتی بادی مونوکلونال انسانی با قابلیت خنثی سازی گسترده در برابر آلفا-نوروتوکسین های طولانی مارها شناسایی و بهینه سازی کردند. این آنتی بادی، توانایی خنثی سازی گسترده این گروه از سموم را داشت و بهینه سازی های صورت گرفته کارایی آن را بهبود بخشید [۴۹]. Sorensen و همکاران در سال ۲۰۲۳ روندهای انتخاب آنتی بادی های scFv در مقابل سموم مارها را با استفاده از استراتژی های نوین بررسی کردند و نشان دادند این روش ها امکان انتخاب آنتی بادی های خنثی کننده برای گروه های مختلف سموم مارها را فراهم می کنند [۵۰]. Charlotte Rimbaud و همکارانش در همان سال فناوری نمایش فاز را برای انتخاب واحدهای متصل به ایپی توپ های ساختاری از توکسین^۱ مارها به کار گرفتند و نتایج نشان دادند که این روش سریع و کارآمد است و می تواند در تشخیص و درمان عفونت های مرتبط با سموم مارها مؤثر باشد [۵۱]. در مطالعه ای دیگر، Nazari و همکاران در سال ۲۰۲۱ با استفاده از این فناوری، آنتی بادی های بازترکیب در مقابل سم مار کبرای ایرانی ناجا اکسیانا^۲ تولید کردند که نشان دهنده اثربخشی بالای این

² Naja Oxiana¹ Toxin



شکل ۴- سیر زمانی پژوهش‌های انجام‌شده بر روی سموم جانوری و توکسین‌ها از سال ۱۹۸۹ تا ۲۰۱۴، شامل مطالعه‌های شاخص بر روی کروتوکسین، ملاتین، α-کبراتوکسین و سم عقرب توسط پژوهشگران مختلف [۴۱].



شکل ۵- شماتیک جامع روش نمایش فاز برای تولید پادزهر. فرایند با ایمن‌سازی مرغ‌ها با پروتئین‌های سم هدف آغاز می‌شود و شامل جداسازی سلول‌های B هدف حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی و استخراج mRNA^۱ آن‌ها است. پس از سنتز cDNA و تقویت ژن‌های VH و VL، تولید آنتی‌بادی مونوکلونال IgY^۲ انجام می‌شود و فازمیدهای ScFv کلون‌شده در سلول‌های *Escherichia coli* بیان می‌گردند. فازمیدهای خاص با استفاده از فازهای کمکی نجات می‌یابند و پس از عفونت مجدد و تکثیر در میزبان، از طریق بیوپنینگ مبتنی بر غربالگری، میل ترکیبی با آنتی‌ژن بی‌حرکت فاز جامد غنی‌سازی می‌شوند. در نهایت، فازمیدهای خاص شسته و بازیابی^۳ می‌شوند و کلون‌های^۴ مثبت با الیزا^۵ غربالگری و شناسایی می‌شوند تا آنتی‌بادی‌های ضدزهر منتخب برای بیان و توسعه بیشتر انتخاب شوند [۲۶].

¹ Messenger RNA

² Immunoglobulin Y

³ Elution

⁴ Clone

⁵ Elisa

جدول ۱- خلاصه‌ای از مطالعه‌های انجام‌شده درباره کاربردهای فناوری نمایش فاز.

نتایج کلیدی	هدف مطالعه	سال	منبع
توسعه روش بیوپنینگ و به کارگیری فاز در نمایش پروتئین‌ها	معرفی فناوری نمایش فاز	۱۹۸۵	[۱]
ایجاد کتابخانه آنتی‌بادی از سلول‌های B غنی‌شده طحالی موش درمقابل کروتوکسین	تولید آنتی‌بادی با استفاده از نمایش فاز	۱۹۹۵	[۳۷]
توسعه ۱۴ کلون آنتی‌بادی scFv فاز انسانی با خنثی‌سازی کروتوکسین	تولید آنتی‌بادی ضدکروتوکسین	۲۰۰۰	[۳۹]
تولید ایمونوزن‌هایی که پاسخ ایمنی اختصاصی و مؤثر درمقابل سم‌ها ایجاد می‌کنند	انتخاب و شناسایی میموتوپ‌های سمی از کتابخانه‌های پپتیدی به‌منظور تولید ایمونوزن‌های ایمن و مؤثر	۲۰۰۲	[۳۶]
انتخاب پپتیدهای با اتصال بالا و اختصاصی به اهداف پروتئینی، با قابلیت استفاده درمانی مشابه آنتی‌بادی‌ها	بررسی پتانسیل پپتیدهای به‌دست‌آمده از نمایش فاز به‌عنوان جایگزین آنتی‌بادی‌ها برای درمان‌های هدفمند	۲۰۰۴	[۳۸]
به کارگیری نمایش فاز برای جداسازی و کشف آنتی‌بادی‌های با میل ترکیبی بالا	کاربرد نمایش فاز در کشف آنتی‌بادی‌ها	۲۰۰۴	[۳]
توسعه آنتی‌بادی‌های فاز خاص که می‌توانند سمیت زهر مار را کاهش دهند	تولید آنتی‌بادی ضد زهر کروتوکسین	۲۰۰۹	[۳۵]
توسعه scFv انسانی که توانایی کاهش سمیت سم مار بوتریس جاراراکوسو را داشتند	تولید آنتی‌بادی درمقابل سم بوتریس جاراراکوسو	۲۰۱۳	[۴۰]
انتخاب کلون‌های scFv با فعالیت بازدارندگی در برابر سم مار بوتریس جاراراکوسو	انتخاب آنتی‌بادی‌های فاز برای سم مار	۲۰۱۳	[۴۱]
پپتیدها به‌طور خاص به سلول‌های سرطانی متصل شدند و پتانسیل بیومارکر تشخیصی و هدف‌گیری درمانی را داشتند	شناسایی پپتیدهای اختصاصی برای سلول‌های سرطانی مری از طریق نمایش فاز	۲۰۱۴	[۴۲]
آنتی‌بادی‌ها اختصاصی بودند، سلول‌های سرطانی هیپوکسی را شناسایی کردند و قابلیت استفاده در تشخیص و هدف‌گیری دارویی را داشتند	شناسایی آنتی‌بادی scFv برای بیومارکر PKM2 در سرطان کبد با استفاده از نمایش فاز	۲۰۱۶	[۴۳]
تولید آنتی‌بادی‌های محافظت‌کننده در برابر اثرهای خون‌ریزی سم D. Acutus	تولید کتابخانه فاز برای سم D. Acutus	۲۰۱۶	[۴۴]
تولید پپتیدهای بازدارنده PLA2 با استفاده از فاز M13 برای خنثی‌سازی سم	مهارکننده فعالیت PLA2 سم مار آبی غربی	۲۰۱۷	[۴۵]
این پادزهرها در مدل حیوانی توانستند اثرهای سمی سم را مهار کنند و جان حیوانات را نجات دهند	تولید آنتی‌بادی‌های چندگلی انسانی با استفاده از نمایش فاز برای خنثی‌سازی سم مار سیاه	۲۰۱۸	[۴۷]
تولید آنتی‌بادی‌های بازترکیب که توانایی خنثی‌سازی سم مار کبرای ایرانی را دارند	تولید آنتی‌بادی درمقابل سم مار کبرای ایرانی	۲۰۲۱	[۵۲]
شناسایی آنتی‌بادی‌های تک‌نوکلئوتیدی مؤثر برای تولید پادزهر با استفاده از نمایش فاز	بهینه‌سازی آنتی‌بادی درمقابل سموم مارها در هند	۲۰۲۳	[۴۸]
کشف آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی با قابلیت خنثی‌سازی گسترده نوروٹوکسین‌های مارها	خنثی‌سازی نوروٹوکسین‌های مارها	۲۰۲۳	[۴۹]
شناسایی آنتی‌بادی‌هایی با خاصیت خنثی‌سازی طیف وسیعی از سموم مارها	تولید آنتی‌بادی‌های scFv درمقابل سموم مارها	۲۰۲۳	[۵۰]
توسعه scFv با قابلیت اتصال مؤثر به اپی‌توپ‌های ساختاری از سم مار	انتخاب آنتی‌بادی درمقابل اپی‌توپ‌های سم مار	۲۰۲۳	[۵۱]

مانند سموم زنبور عسل را فراهم می‌کند. از طریق غربالگری فاز، محققان قادرند آنتی‌بادی‌هایی را که به‌طور خاص این سموم را هدف قرار می‌دهند شناسایی و جدا کنند و در نتیجه درمان‌های هدفمند و مؤثر برای سموم ایجاد کنند.

۲-۴-۲- عملکرد فناوری نمایش فاز در توسعه پادزهرها
استفاده از فناوری نمایش فاز در پیشرفت پادزهرها مزایای متعددی به‌همراه دارد. در درجه اول، این فناوری امکان تولید آنتی‌بادی‌هایی در برابر سموم با ایمن‌سازی ضعیف

اخلاقی باشد. برعکس، روش نمایش فاژ از کتابخانه های نمایش فاژ به عنوان واسطه به منظور شناسایی آنتی بادی های خاص مرتبط با سموم حیوانی استفاده می کند. به این ترتیب، پپتیدها یا قطعه های کوچک تر از سموم حیوانی به فاژها متصل می شوند، که متعاقباً با آنتی بادی ها یا سلول های ایمنی ارتباط برقرار می کنند. این امر شناسایی آنتی بادی های خاصی را که واکنش به سموم حیوانی نشان می دهند تسهیل می کند. سپس این آنتی بادی های خاص می توانند جدا شوند و به عنوان پادزهر مورد استفاده قرار گیرند. با استفاده از روش نمایش فاژ، می توان از مزایای مختلفی از جمله سرعت سریع، کنترل مستقیم بر سموم هدف و همچنین توانایی شناسایی آنتی بادی های خاص بهره برد. علاوه بر این، ضرورت استفاده از حیوانات زنده را از بین برده و در نتیجه هزینه ها و مسائل اخلاقی مرتبط با آزمایش حیوانات کاهش داده می شود. در کل، فناوری نمایش فاژ یک جایگزین بالقوه برای تکنیک های سنتی تولید پادزهر ارائه می دهد، به ویژه در شرایطی که پادزهرهای خاص ممکن است در دسترس نباشند [۵۷، ۵۸].

۲-۵- کاربرد نمایش فاژی در دیگر فراورده های بیولوژیک

فناوری نمایش فاژ نقش مهمی در ساخت واکسن با امکان شناسایی و اهداف آنتی ژنی، تولید نامزدهای جدید واکسن و کشف اپی توپ های ایمنی ایفا می کند. با استفاده از کتابخانه های نمایش فاژ، می توان اهداف آنتی ژنی که می توانند پاسخ ایمنی را برانگیزند شناسایی کرد [۵۹]. این فناوری همچنین می تواند برای نقشه برداری اپی توپ های شناسایی شده توسط آنتی بادی ها یا سلول های ایمنی استفاده شود. با نمایش قطعات یا پپتیدهای پاتوژن هدف بر روی فاژها، برهم کنش های خاص با آنتی بادی های خنثی کننده یا گیرنده های ایمنی شناسایی می شود [۶۰].

نمایش فاژ توسعه و بهینه سازی واکسن های نامزد را امکان پذیر می کند. محققان می توانند از کتابخانه های نمایش فاژ برای شناسایی و انتخاب آنتی ژن ها یا اپی توپ هایی که پاسخ های ایمنی قوی و خاص را ایجاد می کنند استفاده کنند [۶۱]. کتابخانه های نمایش فاژ تولید شده از مجموعه ایمنی افراد واکسینه شده یا افراد با ایمنی طبیعی می توانند برای شناسایی اهداف آنتی ژنی و اپی توپ های شناسایی شده توسط پاسخ های ایمنی محافظتی استفاده شوند. این رویکرد

علاوه بر این، فناوری نمایش فاژ به پروتکل های ایمن سازی و غربالگری جامعی نیاز دارد که معمولاً در تولید پادزهرها به کار می رود؛ به همین دلیل، تأمین پایدار و قابل اعتماد آنتی بادی ها برای تولید پادزهر تضمین می شود و تغییرپذیری که ممکن است در روش های حیوانی ایجاد شود، کاهش می یابد [۴۵، ۵۴]. این آنتی بادی ها را می توان با استفاده از فناوری نمایش فاژ انتخاب و اصلاح کرد و بدین ترتیب کارایی آن ها در خنثی سازی سموم افزایش می یابد.

بالین حال، قابل توجه است که فناوری نمایش فاژ در توسعه پادزهرها هنوز یک رویکرد نسبتاً نوپا است و برای پیاده سازی آن در مقیاس بزرگ تر و در تولید پادزهرهای مؤثر برای طیف گسترده ای از سموم، نیاز به تحقیق ها و بهینه سازی بیشتر دارد [۲۷].

در نتیجه، استفاده از فناوری نمایش فاژ در پیشرفت پادزهرها دارای مزایای متعددی است که شامل تولید آنتی بادی ها در برابر سموم با ایمن سازی ضعیف، ساده سازی فرایندهای تولید، تقویت پروفایل های ایمنی و بهینه سازی آنتی بادی های بسیار مؤثر است. این فناوری پتانسیل ایجاد انقلابی در تولید پادزهرها و ایجاد درمان های مؤثرتر و ایمن تر برای سموم را در خود جای داده است. علاوه بر این، تولید کنترل شده و قابل تکرار آنتی بادی ها با استفاده از فناوری نمایش فاژ، تأمین بی وقفه پادزهرها با پروفایل های ایمنی پیشرفته را تضمین می کند [۵۵]. همچنین، این فناوری امکان توسعه پادزهرهایی که به طور همزمان سموم متعدد را هدف قرار می دهند، فراهم می آورد که در نتیجه یک اثر بازدارنده طیف گسترده ای ایجاد می کند. این رویکرد می تواند پادزهرهایی ایجاد کند که قادر به محافظت در برابر طیف وسیعی از سموم باشند و در نتیجه کاربرد و کارایی آن ها را افزایش دهند [۵۶].

۲-۴-۳- مقایسه روش حیوانی و نمایش فاژی در پادزهرها

روش معمول استفاده از حیوانات شامل تزریق سم به حیوانات است، با این فرض که آن ها مقاومت کافی در برابر اثرهای سمی دارند. به طور معمول، این حیوانات شامل میمون، اسب یا گاو هستند. پس از آن، آنتی سرم از خون این حیوانات جمع آوری می شود که سپس به منظور به دست آوردن پادزهر تحت فراوری و تصفیه قرار می گیرند. این روش خاص می تواند زمان بر، پرهزینه و مملو از معضل

توسعه یافته‌اند [۷۸]. نمایش فاز، فناوری مهمی در شبیه‌سازی و مطالعه کتابخانه‌های ایمنی انسان است که به پژوهش‌های بیماری‌های خودایمنی کمک می‌کند، از جمله بررسی اختلال خونی AITP^۹ و واکنش‌های آنتی‌ژن-خودآنتی‌بادی در بیماری‌های پورپورای ترومبوسیتوپنیک ترومبوتیک (TTP^{۱۰})، یووئیت حاد قدامی (AAU^{۱۱}) و سایر اختلالات التهابی چشمی خودایمنی [۷۹-۸۲]. نمایش فاز در درمان اختلالات عصبی از طریق قطعه‌های آنتی‌بادی درون سلولی، می‌تواند پروتئین‌های غیرطبیعی داخل سلول را تشخیص داده و آن‌ها را مهار کند، اما ممکن است در داخل سلول با مشکلاتی که وجود دارد، عملکرد این قطعه‌های آنتی‌بادی را تحت تأثیر قرار دهند [۸۳، ۸۴].

توانایی نمایش فاز در پژوهش‌های سرطان برای شناسایی نشانگرهای زیستی، درمان هدفمند و درک مکانیسم‌های زمینه‌ای سرطان و تولید تعداد زیادی لیگاند با میل ترکیبی بالا، آن را به ابزاری مهم در مبارزه با سرطان تبدیل کرده است [۸۵]. نمایش فاز با شناسایی آنتی‌ژن‌های اختصاصی می‌تواند در تشخیص زودهنگام سرطان کمک کند که با شناسایی بیومارکرهای^{۱۲} سرطانی مثل آنتی‌ژن غشایی پروستات^{۱۳} و مزوتلین^{۱۴}، از آن‌ها برای توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی استفاده شوند [۸۶]. این فناوری در توسعه درمان‌های هدفمند با شناسایی پپتیدهایی که به سلول‌های سرطانی متصل می‌شوند، محققان می‌توانند داروهای هدفمندی تولید کنند که به‌طور خاص سلول‌های سرطانی را شناسایی کرده و از بین می‌برند [۸۷]. نمایش فاز به توسعه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای هدف‌گذاری پروتئین‌های سرطانی کمک می‌کند [۸۸]. همچنین جهت بررسی و شناسایی مکانیسم‌های مولکولی سرطان برای توسعه درمان هدفمند آن استفاده می‌شود، برای مثال پپتیدی به پروتئین مهم در تنظیم چرخه سلولی متصل شده و موجب مهار رشد تومور و القای آپوپتوز^{۱۵} در سلول‌های سرطانی می‌شود [۸۹]. نمایش فاز نیز برای شناسایی

به کشف اپی‌توپ‌های حفاظت‌شده و توسعه واکسن‌های طیف وسیع درمقابل پاتوژن‌ها^۱ با تنوع ژنتیکی بالا کمک می‌کند [۶۲]. نمایش فاز می‌تواند شناسایی و بهینه‌سازی ادجوانت‌ها^۲ را که موادی هستند که برای تقویت پاسخ ایمنی به واکسن‌ها اضافه می‌شوند تسهیل کند [۶۳].

نمایش فاز در پژوهش‌های پروتئین-پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد و به شناسایی باقی‌مانده‌هایی که در تشکیل اتصال پروتئین-پروتئین نقش دارند کمک می‌کند. از کتابخانه‌های پپتیدی تصادفی نمایش فاز برای شناسایی شرکای جدید پروتئین‌ها استفاده می‌شود، به‌عنوان مثال در مطالعه تعامل بین پروتئین‌های انتقال غشایی TonB^۳ و BtuF^۴. همچنین در ترسیم میان‌کنش‌های درون سلولی پروتئین‌ها از دامنه‌های مختلف مانند SH3^۵ و PDZ^۶ استفاده می‌شود [۶۴-۶۸]. در آنزیم‌شناسی، نمایش فاز برای تعیین ویژگی‌های سوبسترا و توسعه تعدیل‌کننده‌های مکان‌های فعال و آلوستریک آنزیم‌ها استفاده می‌شود. این تکنیک جهت مطالعه مکانیسم عمل آنزیم‌ها و شناسایی سوبستراهای مختلف پروتئین‌ها اهمیت دارد [۶۹-۷۲]. نمایش فاز یک روش سریع و ارزان برای ترسیم اپی‌توپ آنتی‌ژنی است که در تعامل با آنتی‌بادی نقش دارد [۷۳، ۷۴]. نقشه اپی‌توپ را همچنین، کتابخانه‌های قطعه ژن برای اپی‌توپ‌های با طول بیشتر یا ساختار پیچیده مفید هستند. نمایش فاز پپتید می‌تواند با میموتوپ‌های^۷ انتخابی ترکیبی ترکیب شود تا ساختارهای اپی‌توپ ناپیوسته را تقلید کند. این روش می‌تواند به شناسایی اپی‌توپ‌های^۸ مختلف، از جمله کربوهیدرات و لیپیدها با ویژگی‌های ایمنی پایین، کمک کند [۷۵-۷۷].

اهمیت نمایش فاز در کاربردهای هماتولوژیک درحال افزایش است، به‌طوری‌که با استفاده از فازها به‌عنوان سوبسترا، به شناسایی آنتی‌بادی‌ها یا پروتئین‌های خاص کمک کرده و معرف‌های جدید آنتی‌بادی برای تمایز زیرجمعیت‌های سلولی، درمان‌های هدفمند و تصویربرداری

^۹ Advanced Information Technology Professionals

^{۱۰} Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

^{۱۱} Acute Anterior Uveitis

^{۱۲} Biomarker

^{۱۳} Prostate-Specific Membrane Antigen

^{۱۴} Mesotheline

^{۱۵} Apoptosis

^۱ Pathogen

^۲ Adjuvant

^۳ Tonb Protein

^۴ B12-Transporting Atpase

^۵ Src Homology 3

^۶ Psd-95/Discs Large/Zona Occludens-1

^۷ Mimotope

^۸ Epitope

پادزهرها و درمان های مبتنی بر آنتی بادی تبدیل کرده است؛ به ویژه در حوزه تولید پادزهر، که با شناسایی آنتی بادی های اختصاصی برای سموم، جایگزینی مؤثر برای روش های سنتی فراهم شده و کارایی این فرایند به طور قابل توجهی افزایش یافته است [۹۳].

از سوی دیگر، این فناوری تأثیر چشمگیری در پژوهش های مرتبط با سرطان داشته است. نمایش فاز با شناسایی لیگاندها و آنتی بادی هایی که به طور اختصاصی سلول های سرطانی را هدف قرار می دهند، مسیرهای جدیدی برای درمان های شخصی سازی شده و استراتژی های نوین مقابله با سرطان فراهم کرده است. غربالگری کتابخانه های فاز در مقابل سلول ها و بافت های بدخیم، منجر به شناسایی توالی های پپتیدی خاصی شده است که به نشانگرهای سطحی سلول های سرطانی متصل می شوند و امکان تشخیص زودهنگام و درمان مؤثر سرطان را فراهم می کنند [۹۴].

با پیشرفت روزافزون فناوری های زیستی، انتظار می رود نمایش فاز در حوزه های نوظهور نیز نقش گسترده تری ایفا کند؛ از جمله طراحی واکسن های نو ترکیب که به صورت هدفمند سیستم ایمنی را تحریک می کنند و نیز کشف داروهای جدید برای بیماری های عفونی و مزمن. در آینده، ادغام این فناوری با ابزارهایی مانند هوش مصنوعی و یادگیری ماشین می تواند فرایند غربالگری مولکولی را سریع تر، دقیق تر و کارآمدتر سازد. علاوه بر این، توسعه کتابخانه های متنوع تر و بهینه سازی روش های غربالگری، توانمندی نمایش فاز را در حل چالش های پیچیده زیستی و پزشکی افزایش خواهد داد.

در مجموع، نمایش فاز به عنوان ابزاری منعطف و قدرتمند، نقش بی بدیلی در پیشرفت زیست فناوری و ارائه درمان های نوآورانه ایفا می کند. هم افزایی میان نوآوری های فناوری، رویکردهای محاسباتی و توسعه روش های پیشرفته غربالگری می تواند تحولات چشمگیری در پزشکی دقیق و درمان های شخصی سازی شده ایجاد کرده و مسیر دستیابی به پیشرفت های علمی و فناوری آینده را هموار سازد.

۴- ملاحظات اخلاقی

این مقاله یک مطالعه مروری است و شامل مداخله مستقیم بر روی انسان یا حیوان نمی باشد. در تهیه و نگارش مقاله

لیگاندها و تحویل دارو به سلول های سرطانی، مانند پپتیدی که به سلول های سرطان پروستات متصل می شود، به منظور کاهش سمیت دارو در سلول های سالم به کار می رود [۹۰]. به علاوه نمایش فاز جهت شناسایی آنتی بادی ها در درمان و تشخیص سرطان استفاده می شود. به عنوان مثال، آنتی بادی تراستوزوماب^۱ ضد HER2^۲ و آنتی بادی ستوکسیماب^۳ ضد EGFR^۴ با استفاده از این فناوری به ترتیب برای درمان سرطان پستان HER2 مثبت و سرطان روده استفاده می شوند [۷، ۹۱].

۳- نتیجه گیری

در این مطالعه، فناوری نمایش فاز از جنبه های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. مقاله های تحلیل شده نشان می دهند که این فناوری نه تنها در مهندسی پروتئین و کشف دارو نقش کلیدی دارد، بلکه در توسعه آنتی بادی های درمانی و تولید پادزهرهای اختصاصی بسیار مؤثر بوده است. بررسی مطالعه های مرتبط نشان دادند که استفاده از نمایش فاز در تحقیق های سرطان به شناسایی اهداف درمانی جدید و تولید آنتی بادی های اختصاصی منجر شده است. همچنین، ادغام نمایش فاز با ابزارهای محاسباتی نظیر یادگیری ماشین، امکان بهینه سازی فرایند غربالگری را فراهم کرده و چشم اندازهای نوینی برای حل چالش های زیستی پیچیده و توسعه درمان های نوین ایجاد کرده است [۸، ۹۲].

فناوری نمایش فاز به عنوان یکی از ابزارهای پیشرفته در زیست فناوری، جایگاه ویژه ای در حوزه های مختلف زیست شناسی و پزشکی پیدا کرده است. این فناوری با استفاده از باکتریوفاژها به عنوان ناقل، امکان نمایش طیف گسترده ای از پپتیدها و پروتئین ها را بر روی سطح فاژها فراهم کرده و به ابزاری قدرتمند برای شناسایی مولکول هایی با ویژگی های اتصال اختصاصی تبدیل شده است. این روش نقش اساسی در توسعه آنتی بادی های درمانی، طراحی سیستم های دارورسانی هدفمند و تولید ابزارهای تشخیصی نوین ایفا می کند [۵]. کتابخانه های فاز با تنوع بی نظیر خود منابعی ارزشمند برای شناسایی لیگاندها، پپتیدها و آنتی بادی هایی هستند که انتخاب پذیری بالایی نسبت به اهداف زیستی نشان می دهند. این ویژگی ها، نمایش فاز را به یکی از اجزای اصلی در توسعه داروهای جدید، تولید

³ Cetuximab

⁴ Epidermal Growth Factor Receptor

¹ Trastuzumab

² Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

۴. پپتید: زنجیره‌ای از اسیدهای آمینه که به عنوان قطعه‌های کوچکی از پروتئین‌ها شناخته می‌شوند و می‌توانند با مولکول‌های هدف تعامل کنند.

۵. پروتئین: مولکول‌های بزرگ بیولوژیکی که از زنجیره‌های اسید آمینه تشکیل شده‌اند و برای عملکردهای مختلف در سلول‌ها ضروری هستند.

۶. بایوپنینگ (Biopanning): فرایند انتخاب پپتیدها یا آنتی‌بادی‌های خاص از کتابخانه نمایش فاژ که توانایی اتصال به یک مولکول هدف را دارند.

۷. کتابخانه آنتی‌بادی فاژ: مجموعه‌ای از فاژهای دست‌کاری شده که توالی‌های آنتی‌بادی‌های مختلف را روی سطح خود نمایش می‌دهند و برای شناسایی آنتی‌بادی‌های خاص استفاده می‌شوند.

۸. پادزهر (Antivenom): ماده‌ای که برای خنثی‌سازی سموم حیوانات سمی مانند مارها استفاده می‌شود.

۹. لیگاند: مولکولی که به یک مولکول دیگر مانند گیرنده یا آنزیم متصل می‌شود و باعث فعال‌سازی یا مهار عملکرد آن می‌گردد.

۱۰. آنتی‌بادی: پروتئینی که توسط سیستم ایمنی برای شناسایی و خنثی‌سازی آنتی‌ژن‌ها، مانند ویروس‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شود.

۱۱. اپی‌توپ: بخش خاصی از یک آنتی‌ژن که توسط سیستم ایمنی شناسایی می‌شود و با آنتی‌بادی یا گیرنده سلولی، پیوند برقرار می‌کند.

۱۲. تومور: توده‌ای از سلول‌های غیرطبیعی که می‌تواند سرطانی باشد و به بافت‌های اطراف حمله کند.

۱۳. داروهای هدفمند: داروهایی که به‌طور خاص برای هدف قرار دادن مولکول‌ها یا سلول‌های خاص در بدن طراحی شده‌اند، مانند داروهای ضدسرطان که سلول‌های توموری را هدف قرار می‌دهند.

۱۴. سیستم تحویل دارو: روشی برای ارسال دارو به محل موردنظر در بدن به منظور افزایش اثربخشی و کاهش عوارض جانبی.

۱۵. تشخیص سرطان: فرایندی که به شناسایی وجود و نوع سرطان در بدن از طریق روش‌های مختلف، مانند استفاده از نشانگرهای زیستی و تست‌های آزمایشگاهی کمک می‌کند.

۱۶. نشانگرهای زیستی: مولکول‌هایی که حضور یا پیشرفت یک بیماری را نشان می‌دهند و می‌توانند برای تشخیص و نظارت بر درمان استفاده شوند.

تمامی اصول اخلاقی پژوهش، از جمله امانت‌داری علمی، استناددهی صحیح به منابع، اجتناب از سرقت ادبی، جعل یا دست‌کاری داده‌ها رعایت شده است.

۵- تشکر و قدردانی

از حمایت‌های علمی، راهنمایی‌ها و مشاوره‌های ارزشمند استادان، همکاران، دوستان و تمامی افرادی که به هر نحوی در تهیه، نگارش و بهبود کیفیت علمی این مقاله نقش داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۶- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع مالی، شخصی یا سازمانی در ارتباط با این مقاله مروری وجود ندارد.

۷- سهم نویسندگان

رضا یکانی: طراحی ایده مقاله، جست‌وجوی منابع علمی و نگارش نسخه اولیه مقاله، ویرایش نهایی متن.

علی نظری شیروان (نویسنده مسئول): طراحی ساختار مقاله، نظارت علمی، تحلیل و تفسیر مطالب علمی، بازبینی انتقادی و ویرایش نهایی متن.

مائده سمیعانی‌فرد: استخراج و خلاصه‌سازی داده‌ها و مشارکت در نگارش مقاله.

تمام نویسندگان، نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کرده‌اند و مسئولیت محتوای علمی آن را می‌پذیرند.

۸- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۹- فهرست لغات

۱. فناوری نمایش فاژ: روشی برای نمایش پپتیدها یا پروتئین‌ها روی سطح فاژها که برای انتخاب و شناسایی مولکول‌های هدف استفاده می‌شود.

۲. فاژ (باکتریوفاژ): ویروسی که باکتری‌ها را آلوده می‌کند و در فناوری نمایش فاژ به عنوان وسیله‌ای برای نمایش مولکول‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود.

۳. کتابخانه نمایش فاژ: مجموعه‌ای از فاژهای دست‌کاری شده ژنتیکی که هرکدام پپتیدها یا پروتئین‌های مختلفی را روی سطح خود نمایش می‌دهند.

۱۹. پروتئومیک: مطالعه وسیع پروتئین ها، به ویژه ساختارها و عملکردهای آنها در یک ارگانیسم یا سیستم زیستی.
۲۰. لیپید: مولکول های چربی که در ساختار سلولی نقش دارند و برای عملکرد سلولی ضروری هستند.

۱۷. پروتئین های غشایی: پروتئین هایی که در غشای سلول ها قرار دارند و نقش های مختلفی مانند انتقال مواد یا دریافت سیگنال ها را ایفا می کنند.
۱۸. پروتئین های پوششی فاز: پروتئین هایی که روی سطح فاز قرار دارند و در فناوری نمایش فاز به عنوان وسیله ای برای نمایش مولکول های مورد نظر استفاده می شوند.

۱۰- منابع

1. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228(4705):1315-7.
2. Tian L, Jackson K, Chan M, Saif A, He L, Didar TF, et al. Phage display for the detection, analysis, disinfection, and prevention of *Staphylococcus aureus*. *Smart Med*. 2022;1(1):e20220015.
3. Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries. *J Immunol Methods*. 2004;290(1-2):29-49.
4. Omidfar K, Daneshpour M. Advances in phage display technology for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(6):651-69.
5. Sidhu SS. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 2000;11(6):610-6.
6. Arap MA. Phage display technology: applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*. 2005;28:1-9.
7. Zhang Y. Evolution of phage display libraries for therapeutic antibody discovery. *MAbs*. 2023;15(1):2213793.
8. Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, Motallebnezhad M, Aghebati-Maleki A, Nickho H, et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci*. 2016;23(1):66.
9. Azzazy HM, Highsmith WE, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*. 2002;35(6):425-45.
10. Clackson T, Wells JA. In vitro selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol*. 1994;12(5):173-84.
11. Guellouz A, Valerio-Lepiniec M, Urvoas A, Chevrel A, Graille M, Fourati-Kammoun Z, et al. Selection of specific protein binders for pre-defined targets from an optimized library of artificial helicoidal repeat proteins (alphaRep). *PLoS One*. 2013;8(8):e71512.
12. Sidhu SS, Geyer CR. Phage display in biotechnology and drug discovery. Florida, United States: Boca Raton, Florida : CRC Press; 2015.
13. Pini A, Bracci L. Phage display of antibody fragments. *Curr Protein Pept Sci*. 2000;1(2):155-69.
14. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*. 1991;222(3):581-97.
15. Watkins NA, Ouwehand WH. Introduction to antibody engineering and phage display. *Vox Sang*. 2000;78(2):72-9.
16. 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 Res*. 1991;19(15):4133-7.
17. Marks C, Marks JD. Phage libraries--a new route to clinically useful antibodies. *N Engl J Med*. 1996;335(10):730-3.
18. Barbas CF, 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(18):7978-82.
19. Engberg J, Andersen PS, Nielsen LK, Dziegiel M, Johansen LK, Albrechtsen B. Phage-display libraries of murine and human antibody Fab fragments. *Mol Biotechnol*. 1996;6(3):287-310.
20. Ponsel D, Neugebauer J, Ladetzki-Baehs K, Tissot K. High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation. *Molecules*. 2011;16(5):3675-700.
21. Burkovitz A, Ofra Y. Understanding differences between synthetic and natural antibodies can help improve antibody engineering. *MAbs*. 2016;8(2):278-87.
22. Hairul Bahara NH, Tye GJ, Choong YS, Ong EB, Ismail A, Lim TS. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals*. 2013;41(4):209-16.
23. Hammers CM, Stanley JR. Antibody phage display: technique and applications. *J Invest Dermatol*. 2014;134(2):1-5.
24. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem*. 2017;60(17):7213-32.
25. Wec AZ, Wrapp D, Herbert AS, Maurer DP, Haslwanter D, Sakharkar M, et al. Broad neutralization of SARS-related viruses by human monoclonal antibodies. *Science*. 2020;369(6504):731-6.
26. Choraria A, Somasundaram R, Senniappan J, Rajendran S, Oukkache N, Michael A. Chicken egg yolk antibodies (IgY)-based antivenom for neutralization of snake venoms: a review. *Toxin Reviews*. 2021;41:1-12.
27. Pucca MB, Cerni FA, Oliveira IS, Jenkins TP, Argemí L, Sørensen CV, et al. Bee Updated: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Envenoming Therapy. *Front Immunol*. 2019;10:2090.
28. Pope CG, Stevens MF. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. III. Further studies on enzyme systems which split the antitoxin molecule. *Br J Exp Pathol*. 1951;32(4):314-24.
29. Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*. 2005;23(9):1105-16.
30. León G, Herrera M, Segura Á, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon*. 2013;76:63-76.

31. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990;348(6301):552-4.
32. Ménez A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon*. 1998;36(11):1557-72.
33. Pucca MB, Cerni FA, Peigneur S, Arantes EC, Tytgat J, Barbosa JE. Serrumab: a novel human single chain-fragment antibody with multiple scorpion toxin-neutralizing capacities. *J Immunotoxicol*. 2014;11(2):133-40.
34. Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chem Rev*. 1997;97(2):391-410.
35. Oliveira JG, Soares SG, Soares AM, Giglio JR, Teixeira JE, Barbosa JE. Expression of human recombinant antibody fragments capable of partially inhibiting the phospholipase activity of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009;105(2):84-91.
36. Hernández R, Gazarian TG, Hérion PS, Gazarian KG. Molecular localization and crossreactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. *Immunol Lett*. 2002;80(2):97-103.
37. Meng J, John TR, Kaiser II. Specificity and binding affinity of an anti-crotoxin combinatorial antibody selected from a phage-displayed library. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(12):1969-77.
38. Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today*. 2004;9(12):525-9.
39. Cardoso DF, Nato F, England P, Ferreira ML, Vaughan TJ, Mota I, et al. Neutralizing human anti crotoxin scFv isolated from a nonimmunized phage library. *Scand J Immunol*. 2000;51(4):337-44.
40. Roncolato EC, Campos LB, Pessenda G, Costa e Silva L, Furtado GP, Barbosa JE. Phage display as a novel promising antivenom therapy: a review. *Toxicon*. 2015;93:79-84.
41. Tamarozzi MB, Soares SG, Marcussi S, Giglio JR, Barbosa JE. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(9):1450-7.
42. Zhang ZF, Shan X, Wang YX, Wang W, Feng SY, Cui YB. Screening and selection of peptides specific for esophageal cancer cells from a phage display peptide library. *J Cardiothorac Surg*. 2014;9:76.
43. Liu J, Zhang Q, Chen H, Gao Z, Li Y, Sun Z, et al. Phage display library selection of a hypoxia-binding scFv antibody for liver cancer metabolic marker discovery. *Oncotarget*. 2016;7(25):38105-21.
44. Guo G, Cao Y, Zhu G, Tian Z, Gou Y, Chen C, et al. Screening, tandem expression and immune activity appraisal of *Deinagkistrodon acutus* (pit viper) venom mimotopes from a phage display 12-mer peptide library. *Biotechnol Lett*. 2016;38(11):1867-73.
45. Titus JK, Kay MK, Glaser CJJ. Application of phage display for the development of a novel inhibitor of PLA(2) activity in Western cottonmouth venom. *J Venom Res*. 2017;8:19-24.
46. Gutiérrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura Á, Villalta M, et al. Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: from the lethality neutralization assay to antivenomics. *Toxicon*. 2013;69:168-79.
47. Laustsen AH, Karatt-Vellatt A, Masters EW, Arias AS, Pus U, Knudsen C, et al. In vivo neutralization of dendrotoxin-mediated neurotoxicity of black mamba venom by oligoclonal human IgG antibodies. *Nat Commun*. 2018;9(1):3928.
48. Vanuopadath M, Rajan K, Alangode A, Nair SS, Nair BG. The Need for Next-Generation Antivenom for Snakebite Envenomation in India. *Toxins (Basel)*. 2023;15(8).
49. Ledsgaard L, Wade J, Jenkins TP, Boddum K, Oganessian I, Harrison JA, et al. Discovery and optimization of a broadly-neutralizing human monoclonal antibody against long-chain α -neurotoxins from snakes. *Nat Commun*. 2023;14(1):682.
50. Sørensen CV, Ledsgaard L, Wildenauer HHK, Dahl CH, Ebersole TW, Bohn MF, et al. Cross-reactivity trends when selecting scFv antibodies against snake toxins using a phage display-based cross-panning strategy. *Sci Rep*. 2023;13(1):10181.
51. Rimbault C, Knudsen PD, Damsbo A, Boddum K, Ali H, Hackney CM, et al. A single-chain variable fragment selected against a conformational epitope of a recombinantly produced snake toxin using phage display. *N Biotechnol*. 2023;76:23-32.
52. Nazari A, Samianifard M, Rabie H, Mirakabadi AZ. Recombinant antibodies against Iranian cobra venom as a new emerging therapy by phage display technology. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020;26:e20190099.
53. Yekani R, Nazari Shirvan A, Noofeli M, Samianifard M, Entezari M, Kiani M, et al. Phage display-based selection of high-affinity recombinant antibodies targeting tetanus toxoid. *Cellular, Molecular and Biomedical Reports*. 2025;5(4):277-88.
54. El-Shibiny A, El-Sahhar S. Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. *Can J Microbiol*. 2017;63(11):865-79.
55. Ledsgaard L, Laustsen AH, Pus U, Wade J, Villar P, Boddum K, et al. In vitro discovery of a human monoclonal antibody that neutralizes lethality of cobra snake venom. *MAbs*. 2022;14(1):2085536.

56. Funayama JC, Pucca MB, Roncolato EC, Bertolini TB, Campos LB, Barbosa JE. Production of human antibody fragments binding to melittin and phospholipase A2 in Africanised bee venom: minimising venom toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(3):290-7.
57. Ahmadi S, Knerr JM, Argemi L, Bordon KCF, Pucca MB, Cerni FA, et al. Scorpion Venom: Detriments and Benefits. *Biomedicines*. 2020;8(5).
58. Barbas CF. Phage display : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
59. Almagro JC, Pedraza-Escalona M, Arrieta HI, Pérez-Tapia SM. Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(3).
60. Chan CE, Lim AP, MacAry PA, Hanson BJ. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int Immunol*. 2014;26(12):649-57.
61. Hess KL, Jewell CM. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioeng Transl Med*. 2020;5(1):e10142.
62. Lim TS, Ch'Ng ACW. Phage Display-Derived Antibodies: Application of Recombinant Antibodies for Diagnostics. In: Saxena SK, editor. *Proof and Concepts in Rapid Diagnostic Tests and Technologies*. London: IntechOpen; 2016.
63. Berggård T, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*. 2007;7(16):2833-42.
64. Fuh G, Pisabarro MT, Li Y, Quan C, Lasky LA, Sidhu SS. Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21486-91.
65. Kiewitz A, Wolfes H. Mapping of protein-protein interactions between c-myc and its coactivator CBP by a new phage display technique. *FEBS Lett*. 1997;415(3):258-62.
66. James KJ, Hancock MA, Gagnon JN, Coulton JW. TonB interacts with BtuF, the *Escherichia coli* periplasmic binding protein for cyanocobalamin. *Biochemistry*. 2009;48(39):9212-20.
67. Hertveldt K, Beliën T, Volckaert G. General M13 phage display: M13 phage display in identification and characterization of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*. 2009;502:321-39.
68. Diamond SL. Methods for mapping protease specificity. *Curr Opin Chem Biol*. 2007;11(1):46-51.
69. Kehoe JW, Kay BK. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev*. 2005;105(11):4056-72.
70. Kay BK, Kasanov J, Yamabhai M. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods*. 2001;24(3):240-6.
71. Benhar I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv*. 2001;19(1):1-33.
72. Evans ER, Sutton JM, Gravett A, Shone CC. Analysis of the substrate recognition domain determinants of botulinum type B toxin using phage display. *Toxicon*. 2005;46(4):446-53.
73. Geysen HM, Mason TJ, Rodda SJ. Cognitive features of continuous antigenic determinants. *J Mol Recognit*. 1988;1(1):32-41.
74. Fack F, Hügler-Dörr B, Song D, Queitsch I, Petersen G, Bautz EK. Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. *J Immunol Methods*. 1997;206(1-2):43-52.
75. Mayrose I, Shlomi T, Rubinstein ND, Gershoni JM, Ruppin E, Sharan R, et al. Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(1):69-78.
76. Huang J, Gutteridge A, Honda W, Kanehisa M. MIMOX: a web tool for phage display based epitope mapping. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:451.
77. Förster-Waldl E, Riemer AB, Dehof AK, Neumann D, Brämwig K, Boltz-Nitulescu G, et al. Isolation and structural analysis of peptide mimotopes for the disialoganglioside GD2, a neuroblastoma tumor antigen. *Mol Immunol*. 2005;42(3):319-25.
78. Marks JD, Ouwehand WH, Bye JM, Finnern R, Gorick BD, Voak D, et al. Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. *Biotechnology (N Y)*. 1993;11(10):1145-9.
79. Tsuruta LR, Tomioka Y, Hishinuma T, Kato Y, Itoh K, Suzuki T, et al. Characterization of 11-dehydrothromboxane B2 recombinant antibody obtained by phage display technology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;68(4):273-84.
80. Suggett S, Kirchhofer D, Hass P, Lipari T, Moran P, Nagel M, et al. Use of phage display for the generation of human antibodies that neutralize factor IXa function. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2000;11(1):27-42.
81. Kim Y, Caberoy NB, Alvarado G, Davis JL, Feuer WJ, Li W. Identification of Hnrph3 as an autoantigen for acute anterior uveitis. *Clin Immunol*. 2011;138(1):60-6.
82. Zhang Y, Davis JL, Li W. Identification of tribbles homolog 2 as an autoantigen in autoimmune uveitis by phage display. *Mol Immunol*. 2005;42(11):1275-81.
83. Tsai MK, Lin RH, Hsu BR, Lee PH. Lipofection of pcDNA3-CTLA4-Ig into B cells promotes allogeneic hyporesponsiveness. *Transplant Proc*. 2003;35(1):548-9.

- 84.Jazi MH, Dabaghian M, Tebianian M, Gharagozlou MJ, Ebrahimi SM. In vivo electroporation enhances immunogenicity and protection against influenza A virus challenge of an M2e-HSP70c DNA vaccine. *Virus Res.* 2012;167(2):219-25.
- 85.Yip YL, Ward RL. Application of phage display technology to cancer research. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002;3(1):29-43.
- 86.Wang Y, Gao S, Lv J, Lin Y, Zhou L, Han L. Phage Display Technology and its Applications in Cancer Immunotherapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019;19(2):229-35.
- 87.Saw PE, Song EW. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein Cell.* 2019;10(11):787-807.
- 88.Zahavi D, Weiner L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel).* 2020;9(3).
- 89.Deutscher SL. Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chem Rev.* 2010;110(5):3196-211.
- 90.Pung HS, Tye GJ, Leow CH, Ng WK, Lai NS. Generation of peptides using phage display technology for cancer diagnosis and molecular imaging. *Mol Biol Rep.* 2023;50(5):4653-64.
- 91.França RKA, Studart IC, Bezerra MRL, Pontes LQ, Barbosa AMA, Brígido MM, et al. Progress on Phage Display Technology: Tailoring Antibodies for Cancer Immunotherapy. *Viruses.* 2023;15(9).
- 92.Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* 2007;357(1):39-51.
- 93.Anand T, Virmani N, Bera BC, Vaid RK, Vashisth M, Bardajaty P, et al. Phage Display Technique as a Tool for Diagnosis and Antibody Selection for Coronaviruses. *Curr Microbiol.* 2021;78(4):1124-34.
- 94.Brown KC. Peptidic tumor targeting agents: the road from phage display peptide selections to clinical applications. *Curr Pharm Des.* 2010;16(9):1040-54.