طراحی و تولید انبوه پادتن‌های نوترکیب انسانی و حیوانی از طریق «فناوری نمایش فاژی»[1]

مهدی اربابی قهرودی (استادیار پژوهشی)
ژولیت رشیدیان (کارشناس ارشد پژوهشی)
مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

در ابتدای دهه‌ی ۱۹۹۰، ابداع «فناوری نمایش فاژی» پادتن‌ها منجر به انقلابی در زمینه‌ی تولید پادتن‌های منوکلونال[2] و مهندسی ژنتیک آنها شد. با استفاده از این روش، مخازن ژنی رمزکننده‌ی پادتن‌ها را از گونه‌های مختلف حیوانی یا انسانی کلون‌سازی کرده و کتابخانه‌های ترکیبی ایجاد می‌کنند. این کتابخانه‌ها از طریق فرایند «جایگزینی مخازن ژنی کلون شده در داخل ژنوم فاژ»، در سطح فاژهای رشته‌یی M_{13} ابراز می‌شوند. در پایان، با غربالگری مجموعه‌ی فاژهای نوترکیبِ حاصل (فاژ- پادتن) در حضور پادگن و طی چندین مرحله‌ی انتخاب و تکثیر، فاژهای مؤثر پیوند را انتخاب می‌کنند. درنتیجه، واحدهای کوچک‌تر پیوندشونده‌یی به دست می‌آیند که هم قادرند به پادگن مورد نظر متصل شوند و هم از نظر زیست‌فیزیکی - زیست‌شیمیایی با مولکول‌های اولیه‌ی پادتن‌ها قابل مقایسه‌اند. کاربرد این واحدهای کوچک در مواردی چون تشخیص و درمان سرطان، به‌علت قابلیت نفوذ بیشتر در بافت‌ها و نیز تخلیه‌ی سریع از سرم، ارجحیت دارند. توسعه و تکامل بیشتر این فناوری، تولید پادتن‌هایی را علیه هر نوع پادگن خارجی در محیط آزمایشگاه بدون استفاده از «فناوری هیبریدوما» و یا حتی حیوانات آزمایشگاهی (حذف مرحله‌ی ایمن‌سازی) امکانپذیر می‌کند. پیشرفت‌های فوق منجر به تولید پادتن‌های منوکلونال انسانی با میل ترکیبی و ویژگی بالا علیه پادگن‌های خودی یا ویروس‌های بیماری‌زا می‌شود.

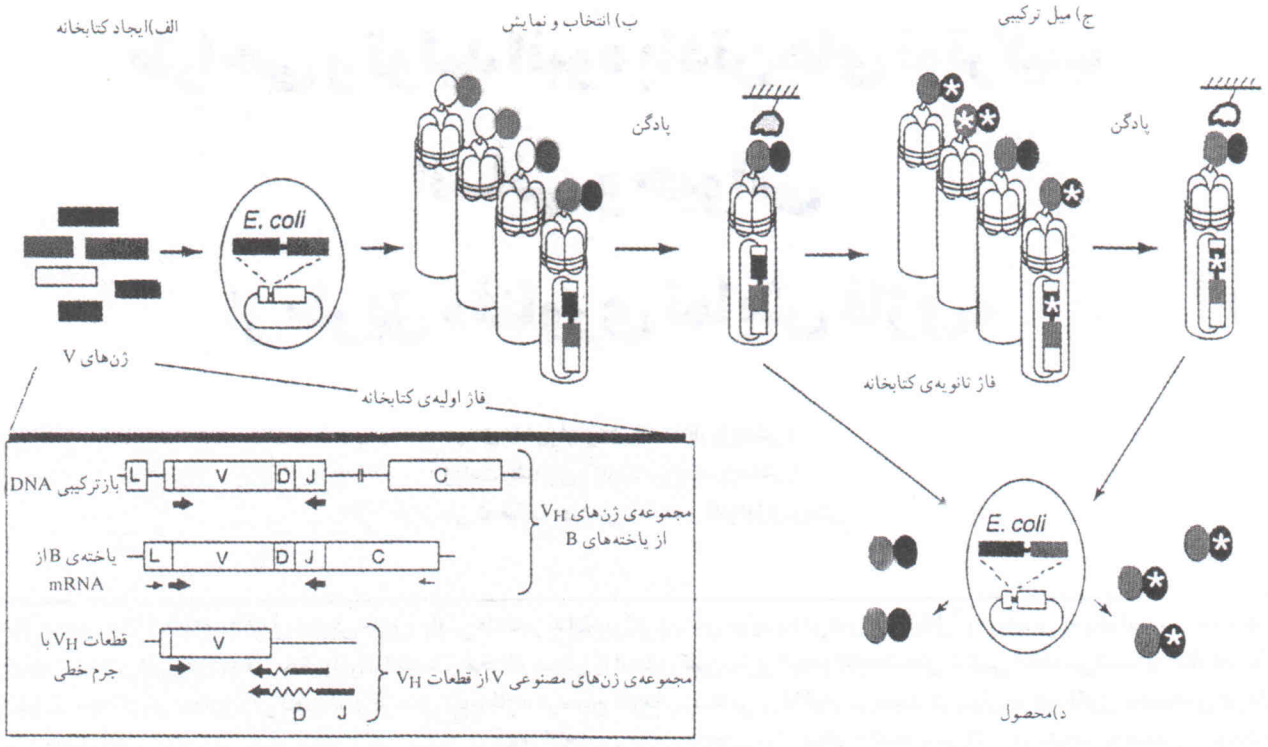
مقدمه

تا پیش از دهه‌ی ۱۹۹۰ میلادی، تولید پادتن‌های منوکلونال یا پادتن‌های تک‌ویژگی از طریق ایجاد هیبریدوما از سلول‌های طحال حیوانات ایمن‌شده امکانپذیر بود.[1] اگرچه تولید این پادتن‌ها در جوندگان به‌آسانی امکانپذیر بود، استفاده‌ی گسترده از آنها به عنوان عوامل تشخیص و درمان تاکنون محدود بوده است و این عمدتاً به دلیل شناسایی این پادتن‌ها به‌عنوان مولکول‌های بیگانه در بدن بیماران است. بنابراین روشن است که پادتن‌های مورد استفاده در درمان بیماری‌ها، باید از نوع انسانی، یا از نظر ساختاری هرچه بیشتر شبیه به نوع انسانی آن باشند.[2]

در طول دهه‌ی گذشته، روش‌های مهندسی پروتیین به‌منظور ایجاد پادتن‌های شبه انسانی[3] از نوع جوندگان توسعه یافته‌اند که اینها شامل ایجاد کیمرهای انسانی-موشی یا شبه انسان‌سازی[4] پادتن‌های موشی بوده است.[3] اخیراً نیز موش‌های تراژن، با راهبردی کاملاً متفاوت، به وجود آمده‌اند که قادر به تولید پادتن‌های انسانی هستند.[4]

پیشرفت‌های مهم در دهه‌های اخیر در زمینه‌های زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک ایمنی[5]، نظیر کشف مجموعه‌ی ژنی ایمونوگلوبولین[6]ها، و نیز توانایی بروز مولکول‌های ایمونوگلوبولین یا «پادگن»[7] در سیستم‌های باکتریایی و فاژی به‌صورت واحد یا مولکول‌های همجوشی[8] منجر به ابداع فناوری نمایش فاژی پادتن‌ها شده است.[8] این فناوری نه‌تنها مشکلات و محدودیت‌های موجود در فناوری هیبریدوما ــ نظیر ناپایداری سلول‌های مولد پادتن منوکلونال، وابستگی به یک گونه (معمولاً به جوندگان)، پایین‌بودن قدرت غربالگری به‌منظور انتخاب بهترین پادتن از نظر میل ترکیبی، و بالاخره عدم دسترسی مستقیم به ژن رمزکننده‌ی پادتن ــ را برطرف می‌کند، بلکه مسیر جدیدی برای تولید مستقیم و دائمی پادتن‌های انسانی و مهندسی ژنتیک آنها فراهم می‌کند.[9و3]

شکل ۱ـ اساس فناوری نمایش فاژی.



الف) ایجاد کتابخانه: ژن‌های V در ناقل‌های سازنده‌ی فاژ برای نمایش در سطح فاژی کلون‌سازی شده‌اند.
ب) از کتابخانه‌های اولیه، پادتن‌های ویژه‌ی پادگن با استفاده از میل ترکیبی غنی‌سازی شده‌اند.
ج) در صورت لزوم پادتن‌های انتخابی از نظر قدرت باندشوندگی با متنوع‌ساختن ترادف‌شان بهبود می‌یابند و در نهایت این امر منجر به ایجاد کتابخانه‌ی دیگری می‌شود. سپس، کلون‌های دیگری که میل ترکیبی بیشتری دارند غنی‌سازی می‌شوند.
د) در پایان می‌توان قطعات محلول پادتن‌ها را به صورت مجزا در باکتری‌ها ابراز کرد. محل پرایمرها برای کلون‌سازی قطعات VH به‌منظور تکثیر ژن‌های نوترکیب DNA یا mRNA در داخل چهارگوش نشان داده شده است.[۱۱]

اساس فناوری نمایش فاژی

براساس آنچه که در شکل ۱ نشان داده شده است، فناوری نمایش فاژی شامل چهار مرحله است: الف) ایجاد کتابخانه از مخازن ژنی بخش متغیر پادتن‌ها؛ ب) انتخاب و غربالگری با استفاده از پادگن خارجی؛ ج) بلوغ میل ترکیبی[۹] یا غنی‌سازی پادتن نوترکیب برپایه‌ی میل ترکیبی؛ د) ابراز در سیستم فاژی و باکتریایی.

چگونگی کلون‌سازی مخازن ژنی بخش متغیر پادتن‌ها را با توضیح پیرامون ساختار ژنتیکی این ژن‌ها و سازوکارهای ایجاد تنوع در پادتن‌ها بیان می‌کنیم:

مخازن ژنی پادتن‌ها در سلول‌های لنفوسیت خونی شامل نواحی رمزکننده برای بخش‌های ثابت و متغیر روی زنجیره‌های سبک و سنگین قرار دارد و تنها نواحی متغیر در هر دو زنجیره یعنی VH و VL برای باندشدن به پادگن خارجی لازم و کافی هستند. از طرف دیگر، ژن‌های نواحی متغیر خود شامل ژن‌های کوچکتری هستند که در یک زنجیره‌ی سنگین ــ شامل سه قطعه‌ی VH، D و JH ــ و یک زنجیره‌ی سبک ــ شامل دو قطعه‌ی VL و JL ــ قرار دارند. این قطعات ژنی نه‌تنها از نظر تعداد و توالی متنوع‌اند، بلکه روش جفت‌شدن آنها تصادفی و غیر قابل پیش‌بینی است. همچنین بر این قطعات، نوعی سازوکار پرجهش‌زایی تنانی[۱۰] (سوماتیک) در سطح DNA انجام می‌شود. مجموعه‌ی این سازوکارهای تنوع‌زایی در کنار روش تصادفی جفت‌شدن دو ناحیه‌ی VH و VL که Fv نام دارد، موجب ایجاد یک مخزن بزرگ تنوع پادتن (با قابلیت حدود 10^{16} نوع) می‌شود.[۱۰] برای ایجاد کتابخانه‌ی ژنی بخش متغیر پادتن‌ها (Fv) از روش PCR و پرایمرهایی که مکمل دوانتهای ژن‌های نوترکیب VH و VL هستند، استفاده می‌شود. با تکثیر قطعات VH و VL و سپس پیوند فیزیکی آنها توسط یک قطعه‌ی پپتیدی، واحد باندشونده یا تک‌زنجیره‌ی Fv (ScFv) به وجود می‌آید.

با کلون‌سازی قطعات DNA از تک‌زنجیره‌ی Fv در ناقل فاژمیدی، و سپس انتقال مجموعه‌ی ژنی کلون‌شده به داخل باکتری اشریشیا کولی، یک

کتابخانه‌ی ترکیبی ایجاد می‌شود. بعداز جمع‌آوری تمامی کلون‌های حاصل از انتقال در یک ظرف، مرحله‌ی Phage rescue یا انتقال مجموعه‌ی کلون‌شده‌ی تک‌زنجیره‌ی Fv در داخل ژنوم فاژ M_{13} و بروز فنوتیپی آن در سطح فاژ انجام می‌شود. با این روش تمامی مخزن ژن کلون‌شده در سطح ژنوتیپ و فنوتیپ در قالب تک‌زنجیره‌ی Fv به داخل جمعیت فاژی منتقل می‌شود که به این ترتیب، نوعی شبیه‌سازی سیستم ایمنی در محیط آزمایشگاه ایجاد شده است که در آن فاژ پادتن‌های حاصل از لحاظ عملکرد شبیه سلول‌های لنفوسیتی B در سیستم ایمنی هستند که پادتن‌های I_gM را در سطح خود بروز می‌دهند.

مراحل دوم و سوم فناوری نمایش فاژی که شامل انتخاب و غربالگری و بلوغ میل ترکیبی است، قراردادن فاژ پادتن‌های به دست آمده در مسیر پادگن‌های مورد هدف نشاندار یا ساکن‌شده در سطح جامد، و جداسازی فاژهای باندشونده از فاژهای غیرباندشونده را دربرمی‌گیرد. فاژهای باندشونده در هر مرحله از آزمایش دوباره به داخل باکتری منتقل می‌شوند و به‌این ترتیب، فاژ پادتن‌ها غنی‌سازی می‌شوند. با تکرار این آزمایش که اصطلاحاً Panning نام دارد و با تعیین دز مناسب پادگن و میزان شست‌وشو یا جهش‌زایی آزمایشگاهی در توالی ژنی پادتن‌های موجود می‌توان به پادتن‌هایی با میل ترکیبی بالا دست یافت.

بعد از انتخاب فاژ-پادتن‌های مناسب و آلوده‌سازی باکتری به‌وسیله‌ی آنها، بروز پادتن‌ها به‌صورت غیر ترکیبی یا مجزا امکانپذیر می‌شود. لازم به ذکر است که ناقل فاژمیدی یک جهش Amber بین ژن رمزکننده‌ی پادتن و ژن رمزکننده‌ی پروتیینی پوششی فرعی دارد و با انتخاب یک میزبان باکتریایی nons-uppressor می‌توان شرایط را برای تولید مولکول پادتن (ScFv) به صورت مجزا آماده کرد. با این روش، امکان بررسی خصوصیات زیست‌فیزیکی-زیست‌شیمیایی پادتن حاصل، نظیر میزان میل ترکیبی، تک‌ویژگی[11]، پایداری[12]، و میزان بروز[13] ممکن می‌شود.[8و11و12و13]

توانایی‌ها و کاربردهای فناوری نمایش فاژی پادتن‌ها

الف) تولید پادتن‌های نوترکیب بدون مرحله‌ی ایمن‌سازی

در گذشته برای تولید و تهیه‌ی پادتن‌های نوترکیب از طریق فناوری نمایش فاژی، از سلول‌های لنفوئیدی حیوانات ایمن‌شده استفاده می‌شد. اصولاً ایمن‌سازی با هدف افزایش تعداد سلول‌های پاسخ‌دهنده به پادگن خارجی، و افزایش میزان mRNA مربوطه در سطح مولکولی است. در کلون‌سازی مخازن ژنی پادتن اینگونه سلول‌ها، ساختن کتابخانه‌های ترکیبی و نهایتاً نمایش فاژی قطعات پادتن‌ها، سهم نسخه‌های ژنی حاصل از سلول‌های پاسخ‌دهنده بالاتر است و یافتن پادتن‌های اختصاصی را در مرحله‌ی انتخاب و غربالگری آسان‌تر می‌کند.

با توجه به قدرت بالای انتخاب و غربالگری سیستم فاژی و توانایی‌های موجود در ایجاد کتابخانه‌های ترکیبی نسبتاً بزرگ (درحدود 10^{10}) از بخش متغیر ایمونوگلوبولین‌ها می‌توان از مرحله‌ی ایمن‌سازی صرف‌نظر کرد. برای این کار دو روش وجود دارد: روش اول استفاده از مخازن ژنی نوترکیب در سیستم طبیعی ایمنی است که در این روش تمامی نسخه‌های ژنی پادتن‌ها در مجموعه‌ی سلول‌های لنفوسیتی کلون‌سازی شده و در سطح فاژ بروز می‌یابند. روش دوم، استفاده از مخازن ژنی سنتزی است.

لازم به یادآوری است که تمامی قطعات ژنی VH، D، J_H، VL، و J_L انسانی، کلون‌سازی شده‌اند و موجودند. با ترکیب تصادفی هریک از ۴۹ قطعه‌ی VH با قطعات متنوع در طول و توالی D و J_H و نیز VL و J_L، می‌توان یک کتابخانه‌ی ترکیبی بسیار بزرگ به وجود آورد که تقریباً علیه هر پادگن خارجی، پادتن با میل ترکیبی در حد میکرومولار وجود دارد. با اضافه کردن عامل جهش‌زایی نقطه‌یی در نقاط مستقیماً درگیر با پادگن یا حلقه‌ها (H_3، H_2 و H_1 برای زنجیره‌ی سنگین و L_3، L_2 و L_1 برای زنجیره‌ی سبک) می‌توان بر میزان میل ترکیبی این پادتن‌ها افزود. با استفاده از این دو روش، پادتن‌های انسانی علیه پروتیین‌ها، بویژه پروتیین‌های انسانی یا پادگن‌های خودی نظیر تیروگلوبولین، عامل TNF*a* تومور پادگن CEA و ده‌ها پادگن خودی دیگر به دست آمده است.[14و15و16] تاکنون تهیه‌ی پادتن علیه پادگن‌های خودی انسانی از طریق دیگر ممکن نبوده است و این یکی از مهم‌ترین دستاوردهای فناوری نمایش فاژی پادتن‌هاست.

ب) انتخاب و تکامل پادتن‌های انسانی علیه ویروس‌ها

پادتن‌ها به‌عنوان عوامل خنثی‌کننده‌ی ویروسی سابقه‌ی تاریخی طولانی دارند، اما یکی از موانع جدی برای ارزیابی این عوامل ضد ویروسی دستیابی به پادتن‌ها منوکلونال انسانی قوی و مؤثر بوده است. با استفاده از فناوری نمایش فاژی می‌توان پادتن‌های منوکلونال انسانی را با میل ترکیبی در حد میکرومولار به دست آورد و سپس قدرت میل ترکیبی و ویژگی این گونه مولکول‌ها را با استفاده از فن CDR-walking افزایش داد. در این روش، جایگاه‌های اسیدآمینه در هریک از CDR[14]ها ــ ناحیه‌هایی که در زنجیره‌های سبک و سنگین مولکول پادتن مستقیماً با پادگن خارجی پیوند و برهم‌کنش دارد، و شامل $HCDR_{1,2,3}$ و $LCDR_{1,2,3}$ است ــ به صورت تصادفی جهش می‌یابد و سپس تأثیر این جهش‌ها بر میل ترکیبی یا میزان ویژگی مولکول این روش به دو صورت موازی و ترتیبی می‌تواند انجام گیرد. در حالت موازی، هریک از CDRهای زنجیره‌ی سنگین و سبک روی مولکول پادتن به طور جداگانه جهش می‌یابد و سپس قدرت باندشوندگی و ویژگی

مولکول حاصل بررسی می‌شود. پس از آن، مجموعه‌ی CDRهای بهبودیافته را در یک مولکول واحد قرار می‌دهند و خواص میل ترکیبی و ویژگی آن را اندازه‌گیری می‌کنند. در روش ترتیبی جهش‌زایی، ابتدا جایگاه‌های اسیدآمینه‌ی CDR اولِ زنجیره‌ی سنگین انجام می‌شود و سپس با CDR دوم ترکیب می‌شود. در این حالت، فرض بر این است که CDRها در باندشدن به مولکول پادگن، با هم نوعی وابستگی دارند. گروهی از محققان با استفاده از این روش میل ترکیبی یک قطعه‌ی پادتن انسانی Fab را که علیه پروتیین gp۱۲۰ ویروس HIV تحریک شده تا حد نانومولار افزایش دهند که برای مقاصد درمانی مناسب است.[۱۹ و ۱۸ و ۱۷]

ج) تولید نسل جدید پادتن‌های دوویژگی[15] و ایمونوتوکسین‌ها

پادتن‌های دوویژگی حاصل از منوکلون‌های هیبریدوما برای درمان سرطان و سایر بیماری‌ها بسیار مناسب‌اند، اما مشکل موجود در تولید و تخلیص آنها کاربرد فنی‌شان را محدود ساخته است. استفاده از قطعات پادتن نوترکیب و اتصال آنها به‌وسیله‌ی قطعات پپتیدی انعطاف‌پذیر نسل جدیدی از پادتن‌های دوویژگی را تشکیل می‌دهد که نه‌تنها مشکلات موجود را برطرف می‌سازد، بلکه به‌دلیل اندازه‌ی کوچک‌ترشان برای درمان مناسب‌ترند. زیرا اولاً بخش Fc مولکول پادتن که می‌تواند هدف سلول‌های واجد گیرنده‌ی Fc باشد، حذف شده است؛ ثانیاً نفوذ این مولکول‌ها به داخل بافت‌ها بیشتر و بهتر است و از سرم نیز سریع‌تر تخلیه می‌شوند.[۲۱ و ۲۰] در این راستا، یک مولکول پادتن دوویژگی که شامل دو تک‌زنجیره‌ی Fv است، طراحی و تولید شده است که یک ویژگی آن مربوط به پادگن CD۳ سلول‌های لنفوسیت T انسانی است و ویژگی دوم آن مقابله با پادگن IA_۱۷ سلول‌های سرطانی پوشش روده‌یی است. مشخص شده است که این مولکول خاصیت یاخته‌کشی بسیار بالایی در غلظت‌های نانومولار دارد و در حال حاضر نیز در مرحله‌ی اول درمانگاهی است.[۲۲]

ایمونوتوکسین‌های متداول، متشکل از پیوند فیزیکی یک پادتن منوکلونال و سمی نظیر سم گیاهی ریسین، سم دیفتری (DT)، سم پسودوموناس (PE) و غیره است. مشکلاتی چون کافی نبودن نفوذ ایمونوتوکسین‌ها در بافت سرطانی، زهرآگینی غیراختصاصی برای سایر سلول‌ها و ناهمگون‌بودن تولیدات ایمونوتوکسین‌ها کاربرد آنها را در سرطان‌درمانی محدود ساخته است. برای حل مشکلات فوق، نسل جدیدی از ایمونوتوکسین‌های مشتق از پادتن‌های نوترکیب به وجود آمده‌اند که شامل یک مولکول تک‌زنجیره‌ی Fv و یکی از سم‌های یادشده است. مثلاً، با پیوند دی‌سولفیدی سم گیاهی ریسین به انتهای C پایه‌ی مولکول تک‌زنجیره‌ی Fv که علیه CD۷ سلول‌های سرطانی لنفوسیت T است، یک ایمونوتوکسین درمانی قوی و مؤثر علیه این نوع بیماری لنفوسیت T به دست آمده است.[۲۴ و ۲۳]

نتیجه‌گیری

در این نوشتار، برخی از کاربردها و قابلیت‌های فناوری نمایش فاژی و پادتن‌های نوترکیب حاصل ارائه شد. اما باید توجه داشت که کاربرد این فناوری محدود به این موارد نیست، و امروزه پادتن‌های نوترکیب در بخش‌های مختلف علوم بنیادی و کاربردی استفاده‌ی فراوانی دارند ازجمله در تولید پادتن‌های نوترکیب در گیاهان ــ به‌عنوان جایگاه‌های تولید پادتن‌ها در مقیاس بالا ــ و یا با هدف مقاوم‌سازی گیاهان در برابر آفت‌ها، تولید آنها در سیستم‌های حیوانی یا حشرات برای تولید بیشتر، و مطالعات بنیادی تنظیم و ابراز ژن با هدف بلوک‌کردن عملکرد ژن‌ها و بررسی تأثیرات آنها.[۲۸ و ۲۷] از سوی دیگر، تاکنون پروتیین‌های دیگری غیر از پادتن‌ها نیز برای مطالعات جهشی در سطح فاژها ابراز شده‌اند[۲۹] که از آن جمله می‌توان به بروز هورمون رشد انسانی ــ با هدف پیداکردن جهش‌یافته‌های جدید این مولکول که میل ترکیبی بیشتری نسبت به گیرنده‌ی خود دارند ــ اشاره کرد. از دیگر کاربردهای مهم این فناوری، نمایش پپتیدهاست که با ایجاد کتابخانه‌های پپتیدی و نمایش آنها در سطح فاژ M_{13} ــ به صورت همجوش با پروتیین عمده‌ی gp۸ ــ می‌توان پیشگیرنده‌های پپتیدی را که می‌توانند ارزش درمانی زیادی داشته باشند، به دست آورد یا به ساختار لیگاندهای گیرنده‌های سلول‌های مختلف، بویژه سلول‌های عصبی پی برد.[۳۱ و ۳۰]

پانوشت‌ها

1. phage display technology
2. monoclonal antibodies
3. human like antibodies
4. humanization
5. immunogenics
6. immunoglobulines
7. fragment antigen binding
8. fusion molecules
9. affinity maturation
10. somatic hypermotation
11. specificity
12. stability
13. expression
14. complementarity determining regions (CDR)
15. bispecific antibodies

منابع

1. Kohler, G. and Milstein, C. *Nature,* **256**, pp.495-497 (1975).
2. Vaughan, T.J., Osbourn, J.K. and Tempset, P.R. *Nature Biotechnology*, **16**, pp. 535-539 (1998).

3. Winter, G. and Milstein, C. *Nature*, **349**, pp.293-299 (1991).
4. Bruggmann, M. and Neuberger, M.S. *Immunology Today*, **17**, pp. 391-397 (1996).
5. Tonegava, S. *Nature*, **302**, pp. 575-581 (1985).
6. Amster, O., Salomon, D., Zemel, A., Zeelon, E.P., Zantor, F. and Schechter, I. *Nucleic Acides Res.*, **8**, pp. 2055-2065 (1980).
7. Smith, G.P. *Science*, **228**, pp. 1315-1317 (1985).
8. McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. *Nature*, **348**, pp. 552-554 (1990).
9. Lang, A.B., Cryz, S.J., Schruch, U., Ganss, M.T. and Bruderet, U. *J. Immunol.*, **151**, pp. 466-472 (1993).
10. Janeway, C.A. and Travers, P. **Immunobiology**, Black Scientific Publications, Oxford, London (1994).
11. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, pp. 433-455 (1994).
12. Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. and Winter, G. *Nucleic Acids Res.*, **19**, pp. 4133-4137 (1991).
13. Barbas III, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A. and Benkovic, S.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, pp. 7978-7982 (1991).
14. Hoogenboom, H.R. and Winter, G. *J. Mol. Biol.*, **227**, pp. 381-388 (1992b).
15. Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Ilolliger, K.P., Gorrick, B.D., Hughes-Jones. N.C., Hoogenboom, H.R. and Winter, G. *EMBO*, **12**, pp. 725-734 (1993).
16. Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Grosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., Prospero, T.D., Hoogenboom, H.R., Nissim, A., Cox, J.P.L., Harrison, J.L., Zacolo, M., Gheradi, E. and Winter, G. *EMBO J.*, **13**, pp. 3245-3260 (1994).
17. Barbas III, C.F. and Burton, D.R. *TIBTECH*, **14**, pp. 230-234 (1994).
18. Burton, D.R. and Barbas III, C.F. *Adv. Immunol.*, **57**, pp. 191-280 (1994).
19. Rader, C. and Barbas III, C.F. *Current Biology*, **8**, pp. 503-508 (1997).
20. Holliger, P. and Winter, G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**, pp. 446-449 (1993).
21. Jost C.R., Titus, J.A., Kuruez, I. and Segal, D.M. *Mol. Immunology*, **33**, pp. 211-219 (1996).
22. Mack, M., Riethmuller, G. and Kufer, P. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA*, **92**, pp.7021-7025 (1995).
23. Brinkmann, U. and Pastan, I. *BBA*, **1198**, pp.27-45 (1994).
24. Pauza, M.E., Doumbia, S.O. and Pennel, C.A. *J. of Immunology*, **158**, pp. 3259-3269 (1997).
25. Conard, U. and Fiedler, U. *Plant Molecular Biology*, **26**, pp. 1023-1030 (1994).
26. Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. and Galeffi, P. *Nature*, **366**, pp. 469-472 (1993).
27. Biocca, S., Neuberger, M.S. and Cattaneo, A. *EMBO J.*, **9**, pp. 101-108 (1990).
28. Marasco, W.A., Haseltine, W.A. and Chen, S.Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, pp. 7889-7893 (1993).
29. Bass, S., Green, R. and Wells, L.A. *Proteins*, **8**, pp. 309-314 (1990).
30. Parmley, S.F. and Smith, G.P. *Gene*, **73**, pp. 305-318 (1988).
31. Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. *Nature*, **380**, pp. 364-366 (1996).