

Bicistronic and Stable Expression of Human Coagulation Factor IX and Enhanced Green Fluorescent Protein in Suspension-Adapted Chinese Hamster Ovary Cells

Fahimeh Ghasemi^{1,2}, Fatemeh Nikumanesh³, Alireza Zomorodipour⁴

1. Assistant professor, Cell and molecular research center, Birjand university of medical sciences, Birjand, Iran, ORCID ID: 0000-0002-5870-3396

2. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5870-3396

3. Assistant professor, *Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.* ORCID ID: 0000-0002-2097-7973

4. Professor, Department of Molecular Medicine, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran. (Corresponding author), Tel: +98 21 44787348, Email: zomorodi@nigeb.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-0671-4779

ABSTRACT

Background and Aim: The current treatment for hemophilia B is replacement therapy, which involves the intravenous infusion of human coagulation factor IX (hFIX) purified from plasma or a recombinant form produced in mammalian cells. In this study, using a bicistronic expression system, the stable expression of the hFIX in a serum-free and suspension-adapted Chinese hamster ovary cell line (CHO-s) was investigated.

Materials and Methods: A DNA fragment consisting of hFIX, Internal Ribosome Entry Site (IRES) and Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) nucleotide sequences was cloned into pcDNA3.1 expression plasmid under the control of Cytomegalovirus (CMV) promoter. The bicistronic plasmid was then linearized using *Bgl*II restriction enzyme and transfected into CHO-s cells. The transfected cells were treated with geneticin for 14 days. The culture medium of the stable cells was then collected and the expression level of the hFIX were examined using western blotting and ELISA. The coagulation activity was also evaluated by the chromogenic method.

Results: The recombinant CHO-s cells resistant to geneticin were observed under a fluorescence microscope in green color, which indicated the expression and accumulation of the EGFP in the cytoplasm of the cells. The results of Western blotting confirmed the expression and secretion of the hFIX into the culture medium. The amount of the secreted hFIX was 150 ng/mL/10⁶ cells with a coagulation activity of 5.6 ± 0.2 mU/mL.

Conclusion: Our findings demonstrated that this bicistronic expression system could simultaneously produce EGFP and hFIX in CHO-s cells. This expression system facilitates selection and isolation of hFIX-expressing cells.

Key words: Human coagulation factor IX, Chinese hamster ovary cell, Enhanced green fluorescent protein, Bicistronic expression.

Received: Oct 1, 2020

Accepted: Dec 28, 2021

How to cite the article: Fahimeh Ghasemi, Fatemeh Nikumanesh, Alireza Zomorodipour. Bicistronic and Stable Expression of Human Coagulation Factor IX and Enhanced Green Fluorescent Protein in Suspension-Adapted Chinese Hamster Ovary Cells. *SJKU* 2023;28(2):12-27.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بیان دو سیستمی و پایدار فاکتور ۹ انعقادی انسانی و پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده در سلول‌های تخمدان همستر چینی سازگار با کشت معلق

فهیمة قاسمی^{۱،۲}، فاطمه نیکومنش^۳، علیرضا زمردی پور^۴

۱. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران. کد ارکید: ۳۳۹۶-۵۸۷۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۲. گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران، کد ارکید: ۳۳۹۶-۵۸۷۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۳. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران، کد ارکید: ۷۹۷۳-۲۰۹۷-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۴. استاد، گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: zomorodi@nigeb.ac.ir تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۴۸، کد ارکید: ۴۷۷۹-۰۶۷۱-۰۰۰۳-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: درمان فعلی هموفیلی B درمان جایگزینی است که شامل تزریق داخل وریدی فاکتور ۹ انسانی خالص شده از پلاسما یا فرم نو ترکیب تولید شده در سلول‌های پستانداران است. در تحقیق حاضر با استفاده از یک سیستم بیانی دو سیستمی، بیان پایدار فاکتور ۹ انسانی در رده سلولی تخمدان همستر چینی سازگار با کشت معلق (CHO-S) و محیط عاری از سرم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: یک قطعه DNA متشکل از توالی‌های نوکلئوتیدی فاکتور ۹ انسانی، جایگاه میانی ورود ریبوزوم و پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده در وکتور بیانی pcDNA3.1 تحت کنترل پروموتور سایتومگالو ویروس همسانه سازی شد. پلاسمید دوسیستمی حاصل با استفاده از آنزیم برشگر *BglIII* خطی و در سلول‌های CHO-S ترانسفکت شد. سلول‌های ترانسفکت شده به مدت ۱۴ روز تحت تیمار با ماده جنتیسین قرار گرفتند. سپس محیط کشت سلول‌های پایدار جمع‌آوری و بیان فاکتور ۹ با استفاده از وسترن بلاتینگ و الایزا بررسی شد. فعالیت انعقادی نیز با روش کروموزنیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: سلول‌های CHO-S نو ترکیب و مقاوم به جنتیسین، زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز مشاهده شدند که حاکی از بیان و تجمع پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده در سیتوپلاسم سلول‌ها بود. نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ، بیان و ترشح فاکتور ۹ نو ترکیب به داخل محیط کشت را تأیید کرد. مقدار فاکتور ۹ ترشح شده $150 \text{ ng/mL}/10^6$ و فعالیت انعقادی آن $0.2 \pm \text{mU/mL}$ محاسبه شد.

نتیجه گیری: یافته‌های ما نشان داد که این سیستم بیانی دو سیستمی توانایی تولید هم‌زمان پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده و فاکتور ۹ انسانی را در سلول‌های CHO-S دارد. این سامانه بیانی، فرایند انتخاب و جداسازی سلول‌های بیان کننده فاکتور ۹ را تسهیل می‌کند.

کلمات کلیدی: فاکتور ۹ انعقادی انسانی، سلول تخمدان همستر چینی، پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده، بیان دوسیستمی.

وصول مقاله: ۹۹/۷/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۰/۹/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۷

مقدمه

هموفیلی B اولین بار در سال ۱۹۵۲ در فردی بنام استفان کریسمس شناسایی و از آن پس با نام بیماری کریسمس نیز نام گذاری شد و بدین طریق از نوع شایع تر هموفیلی (هموفیلی A) متمایز گردید (۱). هموفیلی B نوعی اختلال انعقادی است که در اثر کاهش سطح فاکتور ۹ انعقادی فعال در خون بروز می کند. این بیماری به صورت مغلوب و وابسته به کروموزوم X به ارث می رسد؛ بنابراین زنان کمتر به این بیماری مبتلا می شوند (۲-۴). هموفیلی B دومین نوع شایع هموفیلی (پس از هموفیلی A) است و تخمین زده شده است که از هر ۳۰۰۰۰ تولد زنده مذکر یک نفر به این بیماری مبتلا می شود (۴-۶). این بیماری همه نژادها را به طور یکسان تحت تأثیر قرار می دهد و اولویت نژادی ندارد (۷). درمان اختصاصی و اصلی هموفیلی B، از طریق درمان جایگزینی انجام می شود که شامل تزریق فاکتور ۹ در زمان خونریزی (درمان بر حسب تقاضا) و یا تزریق دوره ای مثلاً چندین بار در هفته (درمان پیشگیرانه) است (۸ و ۹). درمان پیشگیرانه یک روش استاندارد برای درمان بیماران مبتلا به نوع حاد هموفیلی B است. از زمان معرفی فاکتور ۹ انعقادی مشتق از پلاسما در سال ۱۹۹۲، کیفیت و همچنین امید به زندگی این بیماران به طور چشمگیری افزایش یافته است (۱۰ و ۵). طی ۲۰ سال اخیر با پیشرفت های حاصل شده در روش های خالص سازی پروتئین و همچنین غیرفعال سازی ویروس ها، سطح ایمنی محصولات مشتق شده از پلاسما ارتقا یافته است. با این حال همچنان نگرانی هایی راجع به انتقال پروتئین ها، ویروس ها و عوامل بیماری زای نوظهور توسط پروتئین های دارویی مشتق از پلاسما وجود دارد (۱۱). پیش ساز فاکتور ۹ انعقادی از سه بخش عمده تشکیل شده است که شامل پپتید راهنما (پری پپتید) با ۲۸ اسید آمینه، پروپپتید با ۱۸ اسید آمینه و فاکتور ۹ بالغ به طول ۴۱۵ اسید آمینه است. فاکتور ۹ انعقادی انسانی در هپاتوسیت های کبدی به صورت پیش ساز ساخته می شود و قبل از آنکه به

داخل خون ترشح شود پپتید راهنما و پروپپتید پردازش شده و حذف می شوند و فاکتور ۹ انعقادی بالغ به صورت زیموژن وارد جریان خون می شود (۱۲-۱۷). زیموژن فاکتور ۹ انسانی در جریان خون به صورت یک پلی پپتید تک رشته ای به طول ۴۱۵ اسید آمینه و وزن مولکولی حدود ۵۷ کیلو دالتون در گردش است. فعال شدن فاکتور ۹ انعقادی در دو مرحله رخ می دهد که توسط کمپلکس فاکتور بافتی/فاکتور ۷ فعال (TF/FVIIa) یا فاکتور ۱۱ فعال (FXIa) کاتالیز می شود (۱۹ و ۱۸).

کلون سازی ژن فاکتور ۹ انعقادی انسانی در سال ۱۹۸۲ تولید فاکتور ۹ انسانی نو ترکیب را در سلول های تخمدان همستر چینی با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک امکان پذیر ساخت، به طوری که در سال ۱۹۹۸ نوع نو ترکیب فاکتور ۹ انسانی برای اولین بار به صورت تجاری در دسترس قرار گرفت (۵). روش های مهندسی ژنتیک امکان تولید فاکتور ۹ انعقادی در محیط کشت عاری از پروتئین های انسانی و حیوانی و در نتیجه عاری از هرگونه عوامل بیماری زا را فراهم می کند. از این لحاظ فاکتور ۹ انعقادی نو ترکیب جایگاه خوبی را در بین محصولات گوناگون که برای درمان هموفیلی B استفاده می شوند، به دست آورده است. گزارش های اخیر نشان می دهد که در حال حاضر در اسپانیا ۲۸٪ از بیماران هموفیلی B نوع نو ترکیب فاکتور ۹ انعقادی و ۶۴٪ از آنان انواع مشتق شده از پلاسما را دریافت می کنند (۷ و ۵). در ایران فاکتور ۹ خالص شده از پلاسمای افراد نرمال برای درمان بیماران مبتلا به هموفیلی مورد استفاده قرار می گیرد. برخلاف هموفیلی A که انواع زیادی از محصولات نو ترکیب مجوز سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration, FDA) را دریافت کرده است تا سال ۲۰۱۳ فقط یک محصول نو ترکیب از فاکتور ۹ انعقادی با نام تجاری Benefix® (nanocog) alpha برای درمان هموفیلی B در دسترس قرار داشت (۵). در سال ۲۰۱۳ محصول نو ترکیب

لیگاز (Thermofisher scientific, USA) طی مراحل همسانه سازی به منظور برش و اتصال قطعات DNA استفاده شد.

مواد مورد نیاز بخش سلولی:

در مطالعه حاضر از رده سلول‌های CHO-s (Thermofisher scientific, USA) و ماده ترنسفکشن FreeStyl MAX Reagent (Thermofisher scientific, USA) آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال ضد فاکتور ۹ انعقادی (Abcam, UK) و آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با HRP (Millipore, USA) نیز در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

ساخت پلاسمیدهای نوترکیب دوسیسترونی بیان کننده فاکتور ۹ انعقادی و EGFP:

به منظور ساخت پلاسمیدهای نوترکیب دو سیسترونی بیان کننده فاکتور ۹ و پروتئین فلورسنت سبز ابتدا توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی با استفاده از پرایمر hFIX-EcoRI، به عنوان پرایمر رفتی و hFIX-BamHI، به عنوان پرایمر برگشتی، تکثیر شد (جدول ۱). پرایمر رفتی در انتهای ۵ خود دارای توالی کراک و همچنین مجهز به جایگاه برش آنزیمی EcoRI بود. در طراحی پرایمر برگشتی hFIX-BamHI، جایگاه برش آنزیمی BamHI در انتهای ۵ و ۶ کدون اسید آمینه هیستیدین قبل از کدون پایان در نظر گرفته شد. قطعه ۱۴۲۵ جفت بازی حاصل از PCR با استفاده از آنزیم‌های EcoRI و BamHI بریده شده و در جایگاه‌های مشابه در پلاسمید pIRES2-EGFP همسانه سازی شد. پس از تأیید صحت همسانه سازی، توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی به همراه توالی‌های IRES و EGFP با استفاده از آنزیم‌های EcoRI و NotI از پلاسمید فوق خارج شده و در همان جایگاه‌ها در وکتور بیانی pcDNA3.1 وارد شد. پلاسمید نوترکیب حاصل، با روش‌های PCR (با استفاده از پرایمرهای اختصاصی hFIX)، برش آنزیمی و توالی یابی تأیید شد.

دیگری از فاکتور ۹ با نام تجاری Rixubis برای درمان هموفیلی B تأییدیه FDA را دریافت کرد (۱۳).

رده سلول‌های تخمدان همستر چینی (Chinese Hamster Ovary, CHO) به طور رایج برای تولید بسیاری از گلیکوپروتئین‌های نوترکیب دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این روش اغلب از سلول‌های CHO DG44 که امکان تکثیر ژن هدف را فراهم می‌کند به عنوان میزبان برای تولید فاکتور ۹ انسانی نوترکیب استفاده شده است. در تکنولوژی تولید پروتئین نوترکیب دارویی در سلول‌های پستانداران از جمله CHO جداسازی یک کلون پایدار بیان کننده بسیار پر چالش است. استفاده از یک پروتئین گزارشگر می‌تواند فرایند جداسازی کلون‌های نوترکیب پایدار را با استفاده از روش مرتب سازی سلول فعال شده با فلورسنس (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) تسهیل کند (۲۰).

در مطالعه حاضر هدف ما تولید فاکتور ۹ انعقادی انسانی نوترکیب در سلول‌های CHO-s معلق و سازگار برای رشد در محیط کشت عاری از سرم بوده است. به منظور تسهیل جداسازی کلون‌های پایدار، از بیان هم‌زمان فاکتور ۹ انعقادی و پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) به عنوان پروتئین گزارشگر استفاده شد. سپس میزان بیان فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت توسط سلول‌های نوترکیب پایدار مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز برای مراحل کلونینگ:

در این مطالعه سویه Top10 از باکتری اشریشیاکلی (Invitrogen, USA) به عنوان میزبان در مراحل همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از آنزیم‌های برشگر EcoRI, BglIII, BamHI و NotI (Thermofisher scientific, USA) و آنزیم T4

جدول ۱. توالی پرایم‌های مورد استفاده برای تکثیر توالی رمزکننده فاکتور ۹ انسانی. زیر جایگاه‌های برش آنزیمی خط کشیده شده است.

نام پرایم	توالی نوکلئوتیدی (۵' به سمت ۳')	جایگاه برش آنزیمی
فوروارد	5'CCGGAATTCGCCACCATGCAGCGCGTG3'	EcoRI
ریورس	5'CGCGGATCCTCATTAATGATGATGATGATGAGTGAGCTTTGTTTTT TCC3'	BamHI

کشت رده سلول‌های CHO-s:

رده سلول‌های CHO-s به عنوان میزبان برای بیان فاکتور ۹ انسانی نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها برای رشد به صورت معلق در محیط کشت تعریف شده، عاری از سرم و پروتئین‌های انسانی و حیوانی سازگار شده است. سلول‌ها در محیط کشت تعریف شده حاوی L-گلوتامین ۸ میلی مولار کشت داده شدند. در شرایطی که نیاز به جمع‌آوری محیط کشت سلول‌های نوترکیب برای بررسی میزان بیان و فعالیت انعقادی فاکتور ۹ بود، ویتامین K با غلظت نهایی ۵ µg/mL به محیط کشت اضافه شد. سلول‌ها بر روی یک شیکر با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO₂ قرار گرفتند. پاساژ سلول‌ها هر ۴۸ ساعت پس از آنکه تراکم سلولی به حدود $2 \times 10^6 - 1.5 \times 10^6$ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت رسید، انجام شد.

ترانسفکشن سلول‌های CHO-s و ساخت سلول‌های CHO-s بیان‌کننده فاکتور ۹ انعقادی به صورت پایدار: به منظور ساخت سلول‌های CHO-s نوترکیب پایدار، ابتدا پلاسمید نوترکیب دوسیسترونی بیان‌کننده فاکتور ۹ انعقادی و EGFP با استفاده از آنزیم Bgl/II(Thermofisher scientific, USA) به صورت خطی در آمد. سپس با استفاده از ماده ترانسفکشن FreeStyl MAX (Thermofisher scientific, USA) در سلول‌های CHO-s ترانسفکشن شد. پس از گذشت ۲۴

ساعت، سلول‌های CHO-s ترانسفکشن شده، با ماده جنتیسین (G418)(Roche, Germany) با غلظت نهایی ۴۰۰ µg/mL به مدت ۱۴ روز تیمار شدند. اندازه‌گیری کمی فاکتور ۹ انعقادی نوترکیب بیان شده توسط سلول‌های CHO-s پایدار:

سه روز پس از کشت سلول‌های CHO-s نوترکیب بیان‌کننده فاکتور ۹ انعقادی، سوسپانسیون سلولی جمع‌آوری شد. سپس سلول‌ها با سانتریفیوژ کردن به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ rpm رسوب داده شدند. محیط کشت رویی جمع‌آوری شده و مقدار کمی فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت با روش ساندویچ الایزا داخل میکروپلیت‌های پوشیده شده با آنتی‌بادی‌های پلی کلونال ضد فاکتور ۹ که در کیت الایزا (DiagnosticaStago, France) AsserachromIX:Ag فراهم شده بود اندازه‌گیری شد. فاکتور ۹ متصل شده به آنتی‌بادی اولیه با استفاده از یک آنتی‌بادی ثانویه پلی کلونال خرگوشی ضد فاکتور ۹ که با آنزیم پراکسیداز نشاندار شده بود و به شاخص آنتی ژنی دیگری از فاکتور ۹ متصل می شد، آشکار شد. آشکارسازی کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی بر اساس فعالیت آنزیم پراکسیداز بر روی سوبسترا (TMB) انجام شد. در نهایت واکنش‌ها با اضافه کردن اسید سولفوریک متوقف شد و رنگ به دست آمده در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان جذب مشاهده شده نسبت مستقیم با غلظت فاکتور ۹ انسانی دارد. در ضمن محیط کشت جمع‌آوری

شده از سلول‌های ترانسفکت نشده، به عنوان کنترل منفی مورد آزمایش قرار گرفت.

بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت سلولی با روش تغییر رنگ با استفاده از کیت بیوفن: از این آزمایش به منظور بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ نو ترکیب بیان شده توسط سلول‌های CHO-S پایدار استفاده شد. در این روش از پلاسماهای سیترا ته افراد طبیعی به عنوان استاندارد استفاده شد. ابتدا محیط کشت حاصل از سلول‌های CHO-S نو ترکیب از طریق سانتریفیوژ کردن به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰ rpm جمع‌آوری شد. سپس محیط کشت جمع‌آوری شده به نسبت ۵۰:۱ با استفاده از بافر موجود در کیت رقیق شد و در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. ادامه کار طبق دستورالعمل کیت Biophen (France) انجام شد. در این آزمایش از محیط کشت سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. خالص سازی فاکتور ۹ نو ترکیب بیان شده توسط سلول‌های CHO-S نو ترکیب پایدار:

برای خالص سازی فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت، سلول‌های CHO-S پایدار به مدت ۳ روز کشت داده شدند. سپس محیط کشت سلولی با سانتریفیوژ کردن به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ rpm جمع‌آوری شد و با استفاده از بیدهای نیکل خالص سازی فاکتور ۹ نو ترکیب که دارای برچسب هیستیدین ۶ تایی بود انجام شد. بدین منظور، حدود ۲۰ mg بید نیکل (دکتر محمدی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ایران)، توزن شده و در یک فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد شستشوی بیدها توسط ۱ میلی لیتر بافر اتصال انجام شد. پس از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰-۲۰۰۰ rpm بیدها رسوب داده شده و رو شاور تخلیه شد. سپس حدود ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی فاکتور ۹ به بیدهای نیکل اضافه شده و حدود ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی شیکر قرار داده شد. نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰-۲۰۰۰ rpm به مدت ۱ الی ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به طور کامل دور ریخته شد. به رسوب بیدهای

نیکل حاصل از مرحله قبل ۴ میلی لیتر بافر شستشو دهنده اضافه شد و به مدت حدود ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی شیکر قرار داده شد.

نمونه‌ها با دور rpm ۱۰۰۰-۲۰۰۰ به مدت ۱ الی ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و رو شاور به طور کامل تخلیه شد مرحله شستشو مجددا تکرار شد. سپس به منظور جدا کردن پروتئین‌ها از بیدهای نیکل، به رسوب حاصل از مرحله قبل با توجه به غلظت احتمالی پروتئین خالص شده حدود ۵۰۰ µl بافر خارج کننده اضافه شده و به مدت حدود ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی شیکر قرار داده شد. نمونه‌ها با دور rpm ۱۰۰۰-۲۰۰۰ به مدت ۱ الی ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی که حاوی پروتئین‌های خالص شده بود به منظور SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ مورد استفاده قرار گرفت.

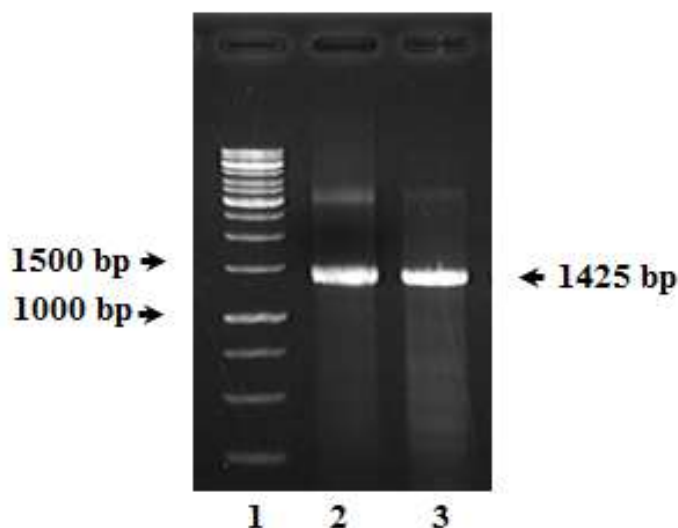
SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ:

به منظور بررسی و تأیید بیان فاکتور ۹ انسانی توسط سلول‌های CHO-S نو ترکیب پایدار، از روش SDS-PAGE و سپس وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی اختصاصی ضد فاکتور ۹ انسانی استفاده شد. بدین منظور ۳ روز پس از کشت سلول‌های پایدار CHO-S، ۱۰ میکرولیتر محیط کشت سلول جمع‌آوری شده و با ۲ میکرولیتر بافر نمونه ۶ برابر غلظت داخل یک ویال ۱/۵ میلی لیتری مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه داخل آب در حال جوشیدن قرار گرفت. سپس نمونه‌ها روی یخ قرار گرفت. به منظور تفکیک باندهای پروتئینی از روش SDS-PAGE استفاده شد که در این روش از ژل جداکننده ۱۲٪ و ژل متراکم کننده ۵٪ استفاده شد. برای انجام وسترن بلاتینگ نیز از روش مرطوب استفاده شد. پس از انتقال پروتئین‌ها به بر روی کاغذ PVDF مراحل ایمونوبلاتینگ انجام شد. ابتدا غشاء در محلول بلوکه کننده (۵٪ شیر خشک بدون چربی حل شده در بافر TBST) روی شیکر به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ۳-۵ بار شستشو با استفاده از بافر TBST هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام شد. به

مدت یک شب مواجهه با آنتی‌بادی پلی کلونال اولیه خرگوشی ضد فاکتور ۹ انسانی (Abcam, UK) با رقت ۱/۲۵۰۰ در سردخانه انجام شد. پس از شستشوی مجدد یک ساعت مواجهه با آنتی‌بادی ثانویه بزی ضد خرگوش (Millipore, USA) با رقت ۱/۲۵۰۰ در دمای آزمایشگاه انجام شد. در نهایت پس از ۳-۵ بار شستشو با بافر TBST تشخیص سیگنال با استفاده از سوبسترای ECL انجام شد.

یافته‌ها

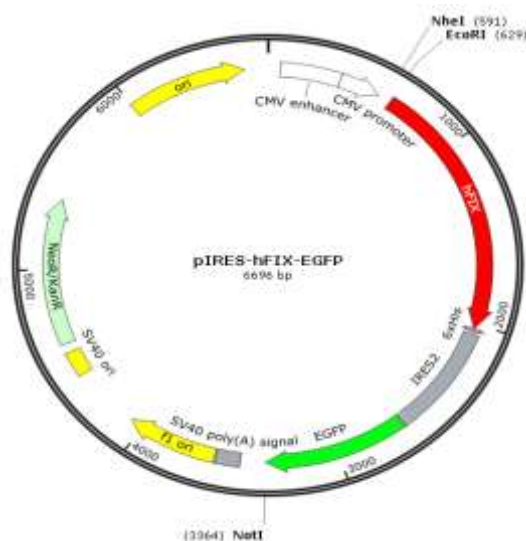
ساخت سازه نوترکیب دو سیستمی بیان کننده فاکتور ۹ انسانی نوترکیب: به منظور سهولت در فرایند تخلیص فاکتور ۹ انسانی با استفاده از بیدهای نیکل، پرایمر برگشتی *hFIX-BamHI* به گونه‌ای طراحی شد تا طی فرایند PCR، ۶ کدون اسید آمینه هیستیدین به انتهای ۳ توالیرمز کننده فاکتور ۹ انسانی اضافه شود تا در نهایت پروتئین نوترکیب فاکتور ۹ با برچسب هیستیدین ساخته شود. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز نشان داد که قطعه‌ای به طول ۱۴۲۵ جفت باز ساخته شده است (شکل ۱).



شکل ۱. محصول PCR حاصل از تکثیر توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی DNA (1kb)، ستون ۲ و ۳: محصول PCR مربوط به توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی با استفاده از پرایمرهای *hFIX-EcoRI* و *hFIX-BamHI*.

سازی گردید و در نهایت پلاسمید نوترکیب pIRES-*hFIX-EGFP* ساخته شد (شکل ۲).

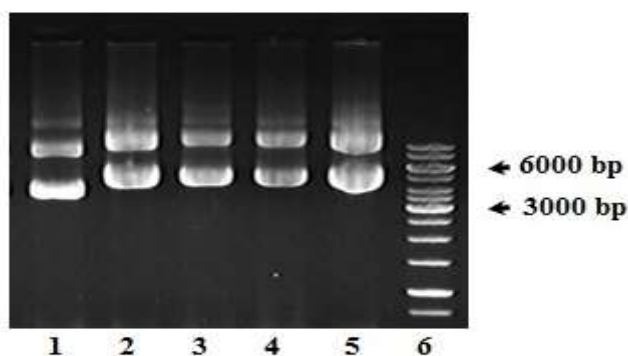
سپس محصول PCR با آنزیم‌های *EcoRI* و *BamHI* بریده شده و در جایگاه‌های مشابه در پلاسمید pIRES2-EGFP و در بالادست توالی IRES همسانه



شکل ۲. شکل شماتیک از پلاسمید دو سیستمی نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP.

به منظور تأیید همسانه سازی، ابتدا استخراج پلاسمید با روش miniprep انجام شد. پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪، الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب با پلاسمید IRES2-EGFP (فاقد cDNA فاکتور ۹) مقایسه شد. نتایج حاصل بیانگر سنگین تر بودن پلاسمیدهای نوترکیب در مقایسه با پلاسمید pIRES2-EGFP بود (شکل ۳).

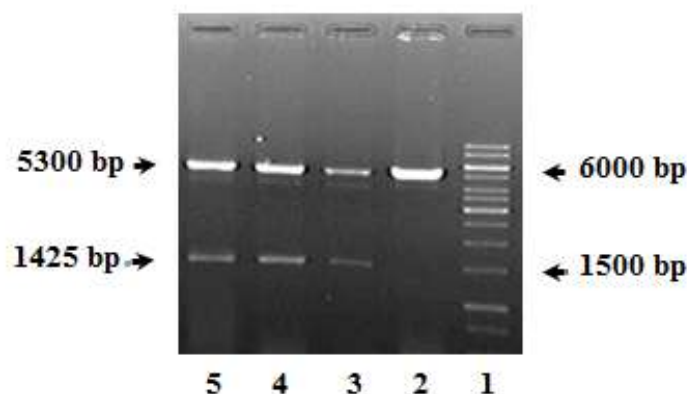
به منظور تأیید همسانه سازی، ابتدا استخراج پلاسمید با روش miniprep انجام شد. پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪، الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب با پلاسمید



شکل ۳. مقایسه الگوی حرکتی پلاسمید pIRES2-EGFP و پلاسمید نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱: پلاسمید pIRES2-EGFP، ستون های ۲ الی ۵: پلاسمیدهای نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP، نشانگر وزن مولکولی DNA (1kb).

پلاسمیدهای نوترکیب خارج شده است که این قطعه در پلاسمید pIRES2-EGFP بریده شده با همان آنزیم ها وجود نداشت (شکل ۴).

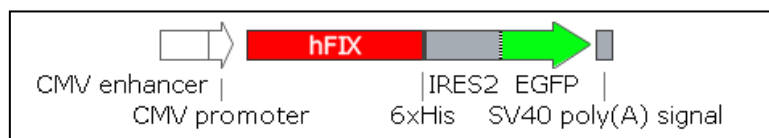
سپس پلاسمیدهای نوترکیب با دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI برش داده شدند و نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که یک قطعه ۱۴۲۵ جفت بازی از



شکل ۴. مقایسه الگوی حرکتی پلاسمید pIRES2-EGFP و پلاسمید نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP برش خورده با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی DNA (1kb)، ستون ۲: پلاسمید pIRES2-EGFP برش خورده با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI، ستون‌های ۳ تا ۵: پلاسمیدهای نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP برش خورده با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI

این مرحله از همسانه‌سازی به منظور قرار دادن توالی رمزکننده فاکتور ۹ در بالا دست توالی نوکلئوتیدی IRES-EGFP انجام شد تا در مرحله بعد کل توالی نوکلئوتیدی

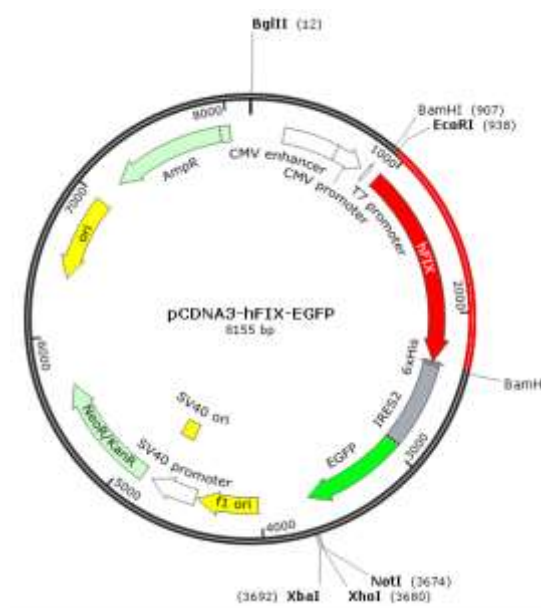
متشکل از hFIX-IRES-EGFP به پلاسمید بیانی pcDNA3.1 وارد شود (شکل ۵).



شکل ۵. نحوه اتصال توالی کدکننده hFIX به توالی نوکلئوتیدی IRES-EGFP در پایین دست پروموتور CMV در وکتور بیانی pcDNA3.1

در پایین دست پروموتور CMV وارد شدند. در نهایت پلاسمید بیانی نوترکیب pcDNA-hFIX-EGFP ساخته شد. (شکل ۶).

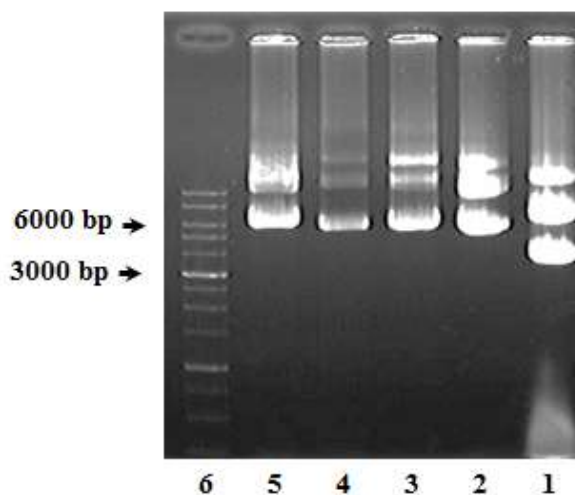
بدین منظور کل قطعه مورد نظر توسط آنزیم‌های *Eco*RI و *Not*I از پلاسمید نوترکیب pIRES2-hFIX-EGFP بریده شده و در جایگاه‌های مشابه در پلاسمید بیانی pcDNA3.1



شکل ۶. شکل شماتیک از پلاسمید دو سیستمی نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP

نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP در مقایسه با پلاسمید pcDNA3.1 بود (شکل ۷).

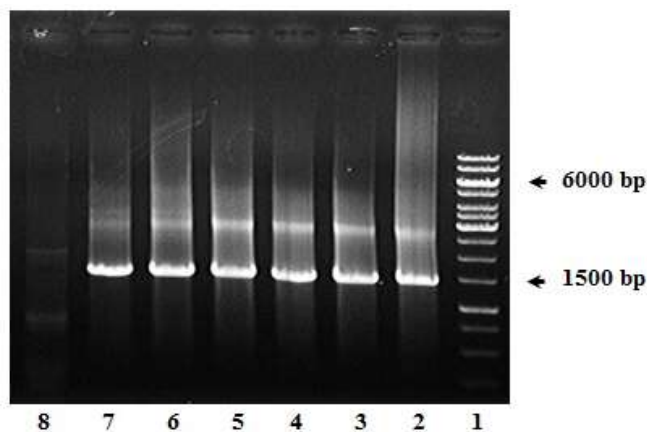
به منظور تأیید همسانه سازی، الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب با پلاسمیدهای غیرنوترکیب pcDNA3.1 بر روی آگارز ۱٪ مقایسه شد. نتایج بیانگر سنگین بودن پلاسمیدهای



شکل ۷. مقایسه الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP با پلاسمید pcDNA3.1 بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱: پلاسمید pcDNA3.1، ستون ۲ تا ۵: پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP، ستون ۶: نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb)

(شکل ۸). همان‌طور که در شکل ۸ مشخص است فقط محصول PCR حاصل از کلون‌های نوترکیب در ناحیه حدود ۱۴۲۵ جفت بازی باند مشخص و متمایزی ایجاد کرده است.

به منظور تأیید بیشتر صحت همسانه سازی، کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی فاکتور ۹ بر روی کلون‌های نوترکیب به دست آمده انجام شد و نتایج آن با کلنی PCR کلون‌های غیر نوترکیب بر روی ژل آگارز ۱٪ مقایسه شد



شکل ۸. کلنی PCR کلون‌های نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP در مقایسه با کلنی PCR کلون‌های غیر نوترکیب. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb)، ستون ۲ تا ۷: کلونی PCR کلون‌های نوترکیب، ستون ۸: کلونی PCR کلون‌های غیر نوترکیب.

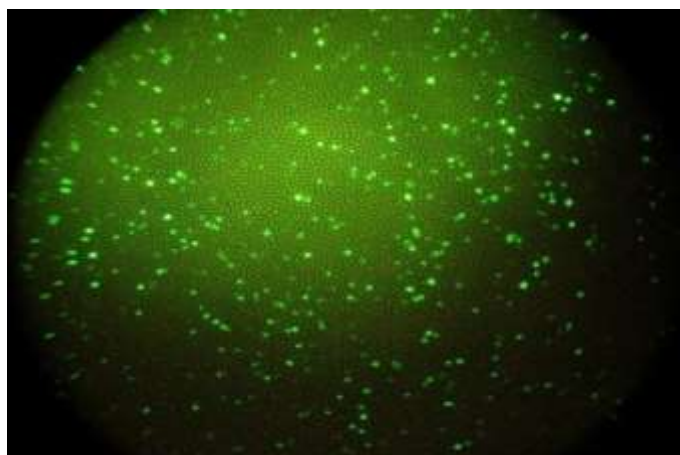
در نهایت به منظور تأیید نهایی صحت توالی hFIX همسانه سازی شده، توالی یابی ژن مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توالی رمزکننده فاکتور ۹ انسانی (hFIX-EcoRI و hFIX-BamHI) به عنوان آغازگرهای رفتی و برگشتی انجام شد (شکل ۹).



شکل ۹. بخشی از نتیجه توالی یابی cDNA فاکتور ۹ انسانی کلون شده در پلاسمید نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGF با استفاده از پرایمر رفتی hFIX-EcoRI.

نهایی ۴۰۰ μg/mL زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز درخشان مشاهده شدند (شکل ۱۰).

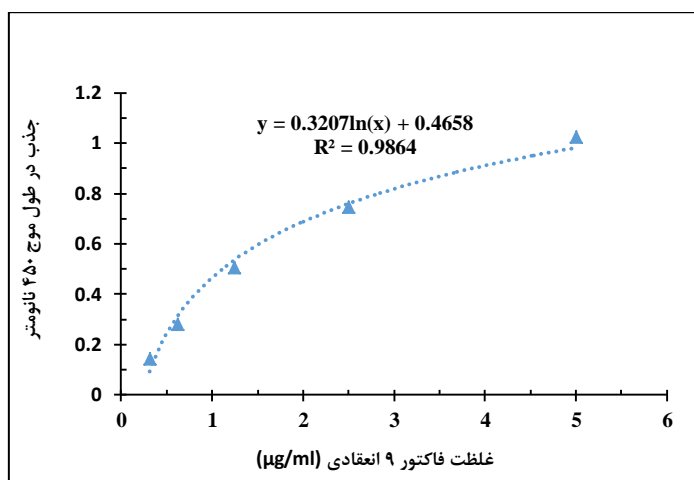
ساخت سلول‌های نوترکیب CHO-s پایدار: سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب خطی شده پس از ۱۴ روز تیمار با ماده جنتیسین (G418) با غلظت



شکل ۱۰. تصویر سلول‌های ترانسفکت شده CHO-s پس از ۱۴ روز تیمار با جنتیسین (G418) زیر میکروسکوپ فلورسنت.

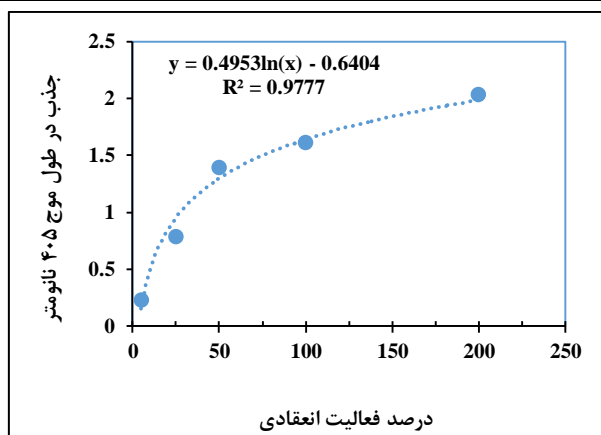
بررسی کمی بیان فاکتور ۹ انعقادی انسانی نو ترکیب با استفاده از روش الایزا:

سه روز پس از کشت سلول‌های نو ترکیب و غیر نو ترکیب (به عنوان کنترل منفی) آزمون الایزا بر روی محیط کشت سلول‌ها انجام شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد (شکل ۱۱) میزان فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت، ۱۵۰ نانوگرم در میلی لیتر محیط کشت به ازای 10^6 سلول به دست آمد.



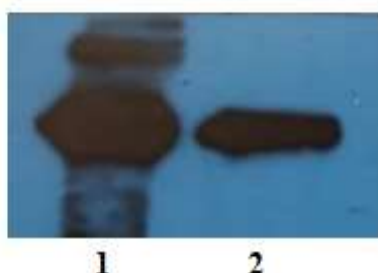
شکل ۱۱. منحنی استاندارد الایزا. محور عمودی نشان دهنده جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور افقی غلظت‌های مختلف فاکتور ۹ پلاسمایی را بر حسب µg/mL نشان می‌دهد.

بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ انسانی نو ترکیب: در این روش محیط کشت سلول‌های نو ترکیب ۳ روز پس از کشت جمع‌آوری و آزمایش فعالیت انعقادی بر پایه کروموزنیک انجام شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد (شکل ۱۲)، میزان فعالیت انعقادی فاکتور ۹ نو ترکیب، 0.2 ± 0.6 mU/mL محاسبه شد.



شکل ۱۲. منحنی استاندارد تست انعقاد. محور عمودی نشان دهنده جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر و محور افقی درصد فعالیت انعقادی را نشان می‌دهد.

SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ: شده بیان فاکتور ۹ نو ترکیب مورد تائید قرار گرفت (شکل ۱۳). پس از انجام SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی اختصاصی فاکتور ۹ بر روی نمونه های خالص



شکل ۱۳. وسترن بلاتینگ فاکتور ۹ نو ترکیب تولید شده توسط سلول های CHO-s پایدار پس از خالص سازی. ستون ۱: فاکتور ۹ مشتق شده از پلاسما به عنوان کنترل، ستون ۲: فاکتور ۹ خالص شده در این مطالعه.

(Heterologous) و قابلیت کشت با دانسیته بالای سلولی به صورت معلق در محیط تعریف شده شیمیایی و عاری از پروتئین، مزایای فراوانی برای تولید پروتئین های دارویی دارند. این سلول ها به عنوان سیستم های انتخابی برای تولید داروهای زیستی تبدیل شده اند. به عنوان مثال تا سال ۲۰۱۲ تقریباً ۷۰٪ از داروهای زیستی در رده سلول های CHO تولید شده است (۲۰ و ۲۱)

بحث

رده های سلولی پستانداران به طور وسیع برای تولید بسیاری از پروتئین های نو ترکیب دارویی مورد استفاده قرار گرفته اند که شامل رده سلولی میلومای موشی NS0 و SP2/0، سلول های CHO، سلول های PerC6، سلول های کلیه جنین انسان (Human Embryonic Kidney 293, HEK) و سلول های کلیه نوزاد همستر (Baby Hamster Kidney, BHK) هستند. سلول های CHO به دلیل دارا بودن ظرفیت بالای تولید پروتئین دگر ساخت

EGFP و IRES با استفاده از آنزیم های *EcoRI* و *NotI* بریده شده و در وکتور بیانی pcDNA3.1 و در پایین دست پروموتور CMV وارد شد. سلول پایدار بیان کننده فاکتور ۹ انسانی از طریق خطی کردن پلاسמיד دو سیستمی نوترکیب و ترانسفکشن آن به داخل سلول های CHO-S و تیمار با ماده جنتیسین ایجاد شدند. سلول های بیان کننده پایدار زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز درخشان رویت شدند. سلول های بیان کننده EGFP را می توان با استفاده از روش سل سورتینگ به صورت جمعیت های مختلف سلولی بر حسب میزان شدت سیگنال فلورسنت آن ها جدا سازی کرد؛ بنابراین استفاده از سیستم های دو سیستمی فرایند جداسازی کلون های نوترکیب و آنالیزهای بعدی آن ها را تسهیل می کند. سلول های پایدار بیان کننده EGFP از نظر بیان پروتئین فاکتور ۹ انسانی با استفاده از تست های الایزا و وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاکی از بیان فاکتور ۹ در سلول های CHO-S بیان کننده EGFP بود. مراحل بعدی این تحقیق می تواند شامل جدا سازی سلول های بیان کننده و انتخاب کلون های نوترکیب دارای بیان بالای فاکتور ۹ و بررسی میزان بیان در طی نسل های بعدی توسط هر یک از کلون ها باشد. این روش اگرچه جداسازی کلون های نوترکیب را تسهیل می کند؛ ولی به دلیل آنکه در این سیستم بیانی فقط یک کپی از ژن وارد ژنوم می شود و تکثیر ژنی رخ نمی دهد، برای تولید انبوه در مقیاس صنعتی مناسب نیست. برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب می توان از طریق ترانسفکشن های متعدد تعداد کپی ژن فاکتور ۹ و در نتیجه راندمان تولید را افزایش داد. بعلاوه بعد از جداسازی و شناسایی کلون نوترکیب بیان کننده با راندمان بالا، لازم است که ژن EGFP با استفاده از روش هایی مجدداً خاموش شود که این امر نیز یکی دیگر از معایب و محدودیت های این سیستم است (۲۱). یکی از راهکارهای افزایش بیان پروتئین نوترکیب در یک سیستم بیانی دگر ساخت (هترولوگ)، بهینه سازی کدون ها (codon optimization) بر اساس

ترانسفکشن پایدار سلول های پستانداران به منظور تولید انبوه بسیاری از پروتئین های نوترکیب دارویی و خالص سازی آن ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است؛ ولی انتخاب یک کلون پایدار بیان کننده پروتئین از بین تعداد زیادی از کلون های نوترکیب، اغلب بسیار زمان بر و پر زحمت است. به منظور افزایش کارایی انتخاب کلون های پایدار، استفاده از یک ژن گزارشگر از جمله EGFP می تواند بسیار سودمند باشد (۲۲). در این مطالعه به منظور تولید سلول های CHO-S پایدار بیان کننده فاکتور ۹ انسانی، از یک سیستم بیانی دو سیستمی استفاده شده است. این سیستم بیانی امکان بیان همزمان فاکتور ۹ انسانی به همراه پروتئین فلورسنت سبز به عنوان پروتئین گزارشگر را فراهم می کند. به منظور ایجاد سیستم بیانی دو سیستمی که قابلیت بیان همزمان پروتئین فاکتور ۹ و پروتئین فلورسنت سبز را داشته باشد، از وکتور pIRES2-EGFP استفاده شد. این پلاسמיד مجهز به جایگاه داخلی ورود ریبوزوم (Internal Ribosome Entry Site, IRES)، با منشأ ویروس انسفالومیو کاردیتیس، است که بین Multiple cloning Site (MCS) و توالی رمز کننده پروتئین فلورسنت سبز قرار گرفته است و امکان بیان همزمان دو پروتئین از یک mRNA دو سیستمی را فراهم می کند. ترجمه پروتئین اول از ناحیه کلاهک واقع در انتهای ۵' mRNA و ترجمه پروتئین دوم از ناحیه IRES آغاز می گردد (۲۳ و ۲۲)؛ بنابراین یک mRNA امکان بیان دو پروتئین متفاوت را در سلول های پستانداران فراهم می کند. در مطالعه حاضر پروتئین اول فاکتور ۹ انسانی است که به دلیل دارا بودن پپتید نشانه به درون محیط کشت ترشح می شود و پروتئین دوم، پروتئین گزارشگر EGFP، به صورت سیتوپلاسمی باقی می ماند.

برای ساخت وکتور بیان کننده دو سیستمی ابتدا توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی با روش PCR تکثیر شده و در وکتور pIRES2-EGFP در بالادست توالی IRES وارد گردید. سپس مجموعه توالی نوکلئوتیدی فاکتور ۹ انسانی،

codon usage میزبان است. توالی کد کننده فاکتور ۹ انسانی با توالی نوکلئوتیدی طبیعی در که پژوهش‌های قبلی این گروه همسانه سازی و بیان آن در سلول‌های HEK293، با منشأ انسانی، مورد بررسی قرار گرفته بود در این مطالعه نیز در نظر گرفته شد (۲۲). از آنجا که ژن فاکتور ۹ انسانی و همچنین میزبان CHO هر دو یوکاریوتی می‌باشند؛ لذا برای مطالعه اولیه بیان فاکتور ۹ انعقادی در سلول‌های CHO-s بهینه سازی کدون‌ها انجام نشد؛ البته خود می‌تواند به عنوان یک مطالعه مستقل، با عنوان تأثیر بهینه‌سازی کدون‌ها بر اساس codon usage سلول‌های CHO بر میزان بیان فاکتور ۹ انسانی در این سلول‌ها مد نظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

مطالعات ما حاکی از بیان هم‌زمان فاکتور ۹ و پروتئین فلورسنت سبز به صورت دو سیستمی بود. فاکتور ۹ به دلیل دارا بودن پپتید نشانه به محیط کشت ترشح شد درحالی‌که پروتئین فلورسنت سبز به صورت داخل سیتوپلاسمی باقی

ماند. فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت با استفاده از روش SDS-PAGE تأیید شد و مقدار بیان فاکتور ۹ با استفاده از تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. این سیستم فرایند جداسازی کلون‌های نو ترکیب با استفاده از سل سورتینگ، در فاز بعدی مطالعات را تسهیل می‌کند و امکان بررسی بیان پایدار فاکتور ۹ در هر یک از کلون‌های جداسازی شده را فراهم می‌کند. با این سیستم بیانی همچنین می‌توان تعداد نسل‌هایی که بیان فاکتور ۹ انعقادی نو ترکیب را فراهم می‌کنند، مورد مطالعه قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری که امکانات انجام پروژه را فراهم کردند سپاسگزاری می‌گردد. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند. کد اخلاق مطالعه IR.BUMS.REC.1399.260 است.

منابع

1. Giangrande P. Haemophilia B: christmas disease. Expert Opin Pharmacother. 2005;6(9):1517-24.
2. Camerino G, Grzeschik KH, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev P, Lecocq JP, et al. Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (Hemophilia B locus). Proc Natl Acad Sci USA. 1984;81(2):498-502.
3. Ghasemi F, Zomorodipour A, Karkhane AA, Khorramizadeh MR. *In silico* designing of hyperglycosylated analogs for the human coagulation factor IX. J Mol Graph Model. 2016;68:39-47.
4. Chia J, Loubser J, Glauser I, Taylor S, Bass GT, Dower SK, et al. Half-life-extended recombinant coagulation factor IX-albumin fusion protein is recycled via the FcRn-mediated pathway. J Biol Chem. 2018;293(17):6363-73.
5. Franchini M, Frattini F, Crestani S, Sissa C, Bonfanti C. Treatment of hemophilia B: focus on recombinant factor IX. Biologics. 2013;7:33-38.
6. Kundu RK, Sangiorgi F, Wu LY, Kurachi K, Anderson WF, Maxson R, et al. Targeted inactivation of the coagulation factor IX gene causes hemophilia B in mice. Blood. 1998;92(1):168-74.
7. Franchini M, Mannucci PM. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. Orphanet J Rare Dis. 2012;7(1):1-8.
8. Santagostino E, Negrier C, Klamroth R, Tiede A, Pabinger-Fasching I, Voigt C, et al. Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients. Blood. 2012;120(12):2405-11.
9. Sankar AD, Weyand AC, Pipe SW. The evolution of recombinant factor replacement for hemophilia. Transfusion and Apheresis Science. Transfus Apher Sci. 2019;58(5):596-600.
10. Jayandharan GR, Srivastava A. Hemophilia: genetics, diagnosis and treatment. J Genet Syndr Gene Ther. 2011;1:1-12.

11. White II GC, Beebe A, Nielsen B. Recombinant factor IX. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):261-5.
12. Zacchi LF, Roche-Recinos D, Pegg CL, Phung TK, Napoli M, Aitken C, et al. Coagulation factor IX analysis in bioreactor cell culture supernatant predicts quality of the purified product. *Communications Biology.* 2021;4(1):1-19.
13. Windyga J, Solano Trujillo MH, Hafeman AE. BAX326 (RIXUBIS): a novel recombinant factor IX for the control and prevention of bleeding episodes in adults and children with hemophilia B. *Ther Adv Hematol.* 2014;5(5):168-80.
14. Pegg CL, Zacchi LF, Recinos DR, Howard CB, Schulz BL. Identification of novel glycosylation events on human serum-derived Factor IX. *Glycoconjugate Journal.* 2020;37(4):471-83.
15. Zhong D, Smith KJ, Birktoft JJ, Bajaj SP. First epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX is required for its activation by factor VIIa/tissue factor but not by factor XIa. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(9):3574-8.
16. Ghasemi F, Khorramizadeh MR, Karkhane AA, Zomorodipour A. Studying the Expression Efficiencies of Human Clotting Factor IX Analogs, Rationally Designed for Hyper-glycosylation. *Iran J Pharm Res.* 2021;20(2):523-535.
17. Nielsen FS, Schmidt AS, Kristensen AK, Nielsen AD, Kristensen BK, Palm L. Characterisation of recombinant factor IX before and after GlycoPEGylation. *Int J Pharm.* 2020;588:119654.
18. Samis JA, Ramsey GD, Walker JB, Nesheim ME, Giles AR. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. *Blood.* 2000;95(3):943-51.
19. Tuddenham EG, Cooper DN. *The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders* Oxford University Press, USA; 1994.
20. Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(3):917-30.
21. Croset A, Delafosse L, Gaudry J-P, Arod C, Glez L, Losberger C, et al. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol.* 2012;161(3):336-48.
22. Gurtu V, Yan G, Zhang G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229(1):295-8.
23. Khorshidi S, Zomorodipour A, Behmanesh M, Vatandoost J, Bos MH. Functional expression of the human coagulation factor IX using heterologous signal peptide and propeptide sequences in mammalian cell line. *Biotechnol Lett.* 2012;37(10):1773-1781.