

## Investigación, estudio y resultado

Pioneros en lograr la fermentación a escala del colágeno humano recombinante tipo XVII en todo el mundo, desde Jiangsu Trautec Medical Technology han evaluado la eficacia y demostrado que el SRHC tipo XVII puede utilizarse como una novedosa y atractiva materia prima de cosméticos.

*Li Jiajia*  
SENIOR R&D  
MANAGER OF  
TRAUTEC

*Wang Liping*  
TECHNICAL EXPERT  
OF TRAUTEC

*Ji Baihui*  
PRODUCT  
MANAGER OF  
TRAUTEC

*Cao Kaijie*  
SALES MANAGER

*Feng Peiyong*  
SALES MANAGER

*Fu Shengwei*  
SENIOR TECHNICAL  
EXPERT OF  
TRAUTEC

JIANGSU TRAUTEC MEDICAL TECHNOLOGY - DISTRIBUIDO POR SUMMIT COSMETICS EUROPE

### Como importante proteína biológica nativa, el colágeno puede utilizarse ampliamente

en muchos campos como la industria química, la medicina, la alimentación y la cosmética, debido a sus propiedades únicas [1]. El colágeno que se vende actualmente en el mercado es principalmente de origen animal. Sin embargo, durante el procesamiento de los métodos de extracción ácidos, básicos o enzimáticos, la estructura nativa del colágeno se destruye básicamente, y la proteína se degrada gravemente, lo que provoca una fuerte disminución de su bioactividad. Es más, el colágeno de origen animal es una mezcla heterogénea de polipéptidos de diferentes tamaños [2] y la importante diferencia entre los lotes de producción puede dar lugar a calidades inestables de los productos finales. Además del riesgo de enfermedades infecciosas asociadas que traen los animales, como la encefalopatía espongiiforme bovina, el colágeno de origen animal también puede causar

hipersensibilidad inmunológica cuando es consumido por humanos [3-5].

El colágeno humano de tipo XVII es un colágeno transmembrana no fibroblástico, que es un trímero homogéneo compuesto por tres cadenas  $\alpha 1$  (XVII) idénticas y se divide en tres dominios principales: intracelular, transmembrana y extracelular [6]. El colágeno tipo XVII es un componente de los hemidesmosomas de las células y desempeña un papel importante en la interacción entre las células epiteliales y una membrana basal. Puede regular la adhesión celular, la separación, el desarrollo y es importante para la diferenciación y regeneración de los queratinocitos. Además, el mantenimiento del colágeno tipo XVII en las células madre es fundamental para orquestrar la homeostasis de la piel y prevenir el envejecimiento del folículo piloso [7, 8]. Sin embargo, a diferencia del colágeno de tipo I y de tipo III, que son abundantes tanto en los seres humanos como en los

animales, el colágeno de tipo XVII es rastreable en estas dos especies, lo que hace imposible su producción masiva incluso mediante el método de extracción.

Con el desarrollo de la biotecnología, se han producido abundantemente algunos tipos de colágeno humano recombinante. En comparación con el colágeno animal, el colágeno humano recombinante obtenido por fermentación no contiene ningún componente animal, por lo que puede eliminar los problemas de seguridad causados por éstos. Además, el colágeno humano recombinante puede ser altamente bioactivo y suele ser muy o totalmente homólogo al colágeno humano nativo gracias a un diseño racional de aminoácidos. Por lo que sabemos, aunque muchas empresas han realizado la producción a gran escala de colágeno humano recombinante de tipo I y III, todavía no hay información sobre la producción a gran escala de colágeno recombinante de tipo XVII.

Desde Jiangsu Trautec Medical Technology, se ha logrado con éxito

la producción a escala de colágeno recombinante tipo XVII por fermentación con *Pichia Pastories* y el nombre comercial de este producto es SRHC Tipo XVII. El peso molecular de SRHC tipo XVII es de 23,8-kDa y el grado de homología con el colágeno humano tipo XVII es >90%. A continuación, se llevaron a cabo algunos experimentos celulares y se adoptó un modelo de piel *ex vivo* para evaluar la eficacia de SRHC tipo XVII como nueva materia prima para cosméticos, descubriendo que el tratamiento de SRHC tipo XVII puede (1) promover la migración y adhesión celular; (2) aumentar el nivel de expresión de proteínas fundamentales implicadas en la membrana basal; (3) reparar daños

en la unión dermoepidérmica (DEJ) y aumentar significativamente el nivel de expresión endógena de colágeno tipo XVII tanto a nivel transcripcional como traslacional. Demostrando, por lo tanto, que el SRHC tipo XVII puede utilizarse como una materia prima novedosa y atractiva para los cosméticos.

#### **DISEÑO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS Y SELECCIÓN DE CÉLULAS CHASIS PARA LA PRODUCCIÓN DE SRHC TIPO XVII**

Para generar un colágeno recombinante de tipo XVII altamente bioactivo, en primer lugar, nos remitimos a algunos artículos publicados relacionados con el colágeno humano de tipo XVII

y descubrimos que hay muchos sitios atípicos de unión a integrinas activas: los motivos Lys-Gly-Asp (KGD) en el dominio COL15 del colágeno humano de tipo XVII [9]. El motivo KGD puede promover la propagación celular mediada por integrina uniéndose a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha V\beta 1$ . Además de los motivos KGD, también tomamos en consideración algunos otros puntos como otros sitios de unión a integrinas, la estabilidad de la proteína y la viabilidad de la estrategia secretora. Así, la secuencia de aminoácidos resultante de SRHC tipo XVII se compone de 5 regiones del colágeno humano nativo tipo XVII y contiene hasta 10 sitios KGD activos. Además, añadimos la etiqueta Strep-



**HALLSTAR** ✨  
B E A U T Y

**NEW**

### **FILL Oléoactif<sup>®</sup> | Skin filler Phytoside<sup>™</sup>**

- Designed with emblematic Mediterranean plants: *Myrtus communis* (myrtle) and *Olea europaea* (olive)
- Activates natural healing pathways to tackle skin aging
- Modulates innovative key genes and proteins of cell defense, stem cells, epidermal regeneration and dermal remodeling
- Removes skin roughness and erases wrinkles
- Local French sourcing and upcycling using best practices in sustainability

Visit our distributor Safic-Alcan at Cosmetorium 2023 to learn more!

**BOOTH 232**



**Figura 1.** Ilustración esquemática del plásmido utilizado para la expresión recombinante de SRHC tipo XVII.

bacterias gram negativas se conoce como endotoxina, cuya eliminación requiere complicados procesos de purificación, lo que supondrá un gran aumento del coste.

En vista a estas evidencias, decidimos seleccionar *Pichia Pastories* para la producción de SRHC tipo XVII. La expresión secretora es una técnica probada en el sistema de expresión de levaduras mediante la adición de péptidos secretores a la secuencia codificante [10]. Además, *Pichia Pastories* tiene capacidad de modificación post-traduccional, y esto es esencial para el mantenimiento de la bioactividad de las proteínas recombinantes originadas a partir de proteínas humanas.

### PRODUCCIÓN A ESCALA MEDIANTE FERMENTACIÓN BIOLÓGICA CON PICHIA PASTORIES DE SRHC TIPO XVII

En primer lugar, optimizamos la secuencia de bases de la SRHC tipo XVII de acuerdo con el sesgo de uso de codones de *Pichia Pastories*. Después, la secuencia codificante se insertó en el plásmido pPIC9K y el plásmido resultante pPIC9K-C170801 se electroporó en *Pichia Pastories* tras su verificación mediante secuenciación de ADN (Fig.1). Comprobamos el nivel de expresión de SRHC tipo XVII en diferentes cepas y seleccionamos la cepa con mayor nivel de expresión (denominada 170801) para la fermentación a escala. Realizamos un análisis SDS-PAGE del sobrenadante de 170801 después de la fermentación y descubrimos que había una única banda clara (Fig. 2A). Además, adoptamos Western Blot para confirmar que la banda clara es sólo SRHC Tipo XVII con

Tag II a la secuencia N-terminal y la etiqueta 6×His a la secuencia C-terminal para su purificación.

Después de determinar la secuencia de aminoácidos de la SRHC de tipo XVII, buscamos las células chasis adecuadas para la fermentación. Los sistemas de expresión más utilizados para la producción de proteínas recombinantes incluyen el sistema de expresión procariota (por ejemplo, *E. coli*), el sistema de expresión eucariota (por ejemplo, *Pichia Pastories*), el sistema de expresión de células de insecto (baculovirus) y el sistema de expresión de células de mamífero. La proteína recombinante producida por células de mamífero

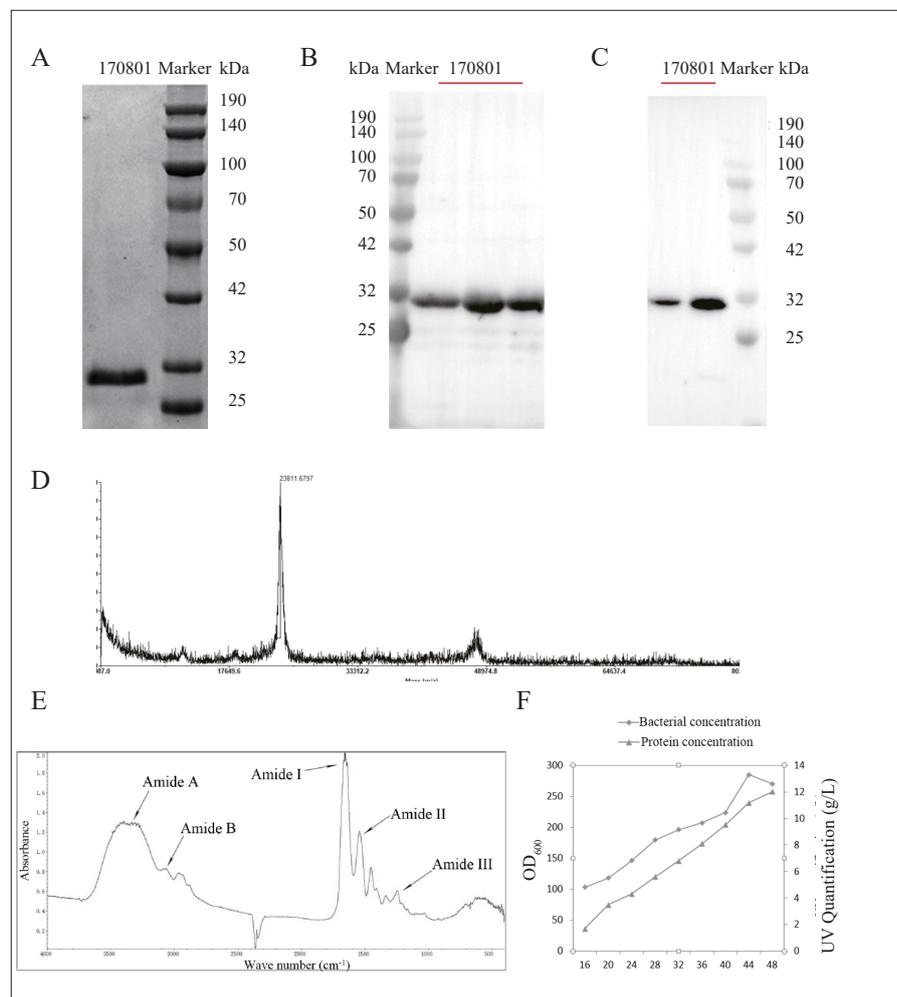
implica un elevado coste de expresión y no es adecuada para la producción masiva de materias primas de cosméticos. El sistema de expresión de células de insecto (baculovirus) no sólo tiene un coste elevado y un rendimiento bajo, sino que también muestra una enorme diferencia con las células humanas en la post-traducción. Aparte de estos dos métodos, la proteína recombinante obtenida mediante el sistema de expresión de *E. coli* no tiene modificación postraduccional y la expresión secretora es difícil de conseguir en *E. coli*. Por lo tanto, es necesaria la lisis celular para la purificación de las proteínas diana. Sin embargo, la pared celular de las

anticuerpos anti-his tag y anti-strep tag II respectivamente (Fig.2B y C).

Los resultados anteriores indicaban que la SRHC de tipo XVII podía producirse eficazmente por secreción. Los resultados de MALDI-TOF MS verificaron además que el peso molecular exacto de SRHC tipo XVII es de aproximadamente 23,8-kDa (Fig.2D). También se pudo detectar un pico característico de colágeno con FT-IR (Fig.2E). Por último, llevamos a cabo la fermentación a escala de SRHC tipo XVII en 170801 y observamos un aumento de la concentración de proteína con la concentración bacteriana, lo que indica el éxito en la fermentación a escala. Además, los resultados de las pruebas de los productos finales, incluyendo SDS-PAGE, Western Blot, MALDI-TOF MS, FT-IR, fueron los mismos que llevamos a cabo en la fermentación de laboratorio y la secuencia de aminoácidos de SRHC tipo XVII fue totalmente la misma que diseñamos después de la verificación por secuenciación de aminoácidos. En conjunto, hemos realizado la fermentación a escala del colágeno recombinante de tipo XVII con estrategia secretora y el grado de homología con el colágeno humano nativo de tipo XVII es >90%.

### PRUEBA DE EFICACIA DE SRHC TIPO XVII COMO NUEVA MATERIA PRIMA PARA COSMÉTICOS

Llevamos a cabo algunas pruebas de eficacia para evaluar si la SRHC tipo XVII podría utilizarse como nueva materia prima para cosméticos. En primer lugar, realizamos algunos experimentos relativos a la bioactividad celular, incluyendo la

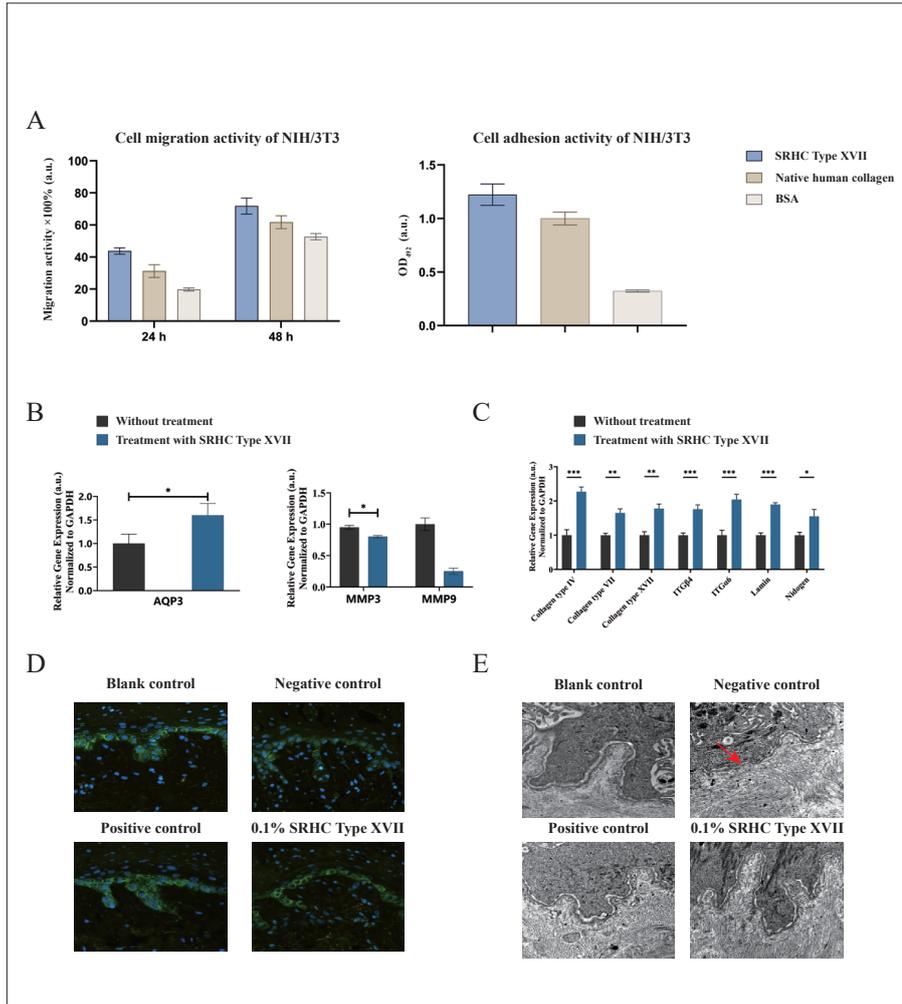


**Figura 2.** Verificación del éxito de la producción secretora de SRHC tipo XVII en *Pichia Pastories*.

- A. Resultado** de SDS-PAGE del sobrenadante de fermentación de 170801. 170801 fué el nombre de una de las células de levadura manipuladas durante el experimento.
- B. Resultado** Western-blot del sobrenadante de fermentación de 170801 (tratado con anticuerpo anti-His tag).
- C. Resultado** Western-blot del sobrenadante de fermentación de 170801 (tratado con anticuerpo anti-strep tag II).
- D. Resultado** MALDI-TOF MS de SRHC Tipo XVII purificada.
- E. Resultados** FT-IR de SRHC Tipo XVII purificada.
- F. Curva** de crecimiento de *Pichia Pastories* modificada y nivel de expresión proteica correspondiente determinado por cuantificación UV en condiciones de fermentación a escala.

actividad de migración celular y la actividad de adhesión celular. Tal y como esperábamos, tras un diseño racional y una cuidadosa selección de la secuencia de aminoácidos del colágeno tipo XVII, el SRHC tipo XVII mostró una bioactividad incluso mayor que el colágeno humano a la hora de promover la migración y la adhesión celular (Fig. 3A).

A nivel transcripcional, observamos un aumento significativo del nivel de expresión del gen que codifica la acuaporina 3 y una disminución del nivel de expresión de los genes que codifican la metaloproteinasas de matriz MMP3 y MMP9, que serían útiles para la hidratación y el mantenimiento del colágeno, respectivamente (Fig. 3B). Tras el



**Figura 3.** Prueba de eficacia de las SRHC de tipo XVII como materias primas para Cosméticos

- A. Migración** celular y actividad de adhesión de las células NIH/3T3.  
**B. Niveles** de expresión del gen AQP3 en células HaCat y de los genes MMP3 y MMP9 en células HFF-1 normalizados respecto a GAPDH cuantificados por qPCR.  
**C. Niveles** de expresión de genes relacionados con el basamento, incluyendo colágeno tipo IV, tipo VII, tipo XVII, ITGβ4, ITGα6, Lamin y Nidogen normalizados a GAPDH cuantificados por qPCR.  
**D. Resultados** de la inmunofluorescencia del colágeno tipo XVII expresado en las células HaCat en la membrana basal.  
**E. Imágenes** de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de la unión dermo-epidérmica.

tratamiento con SRHC tipo XVII al 0,1%, pudimos observar un aumento significativo en el nivel de expresión de proteínas relacionadas con la membrana basal, incluyendo colágeno tipo IV, tipo VII, tipo XVII, ITGβ4, ITGα6, Lamin y Nidogen (Fig.3C), indicando que SRHC tipo XVII tendría una gran eficacia en

la reparación de la DEJ dañada. Así pues, adoptamos un modelo de tejido cutáneo *ex vivo* para confirmar esta conjetura. Utilizamos la tecnología de tinción de inmunofluorescencia y descubrimos que el tratamiento con un 0,1% de SRHC tipo XVII podría aumentar en gran medida el nivel de expresión del colágeno

humano tipo XVII (Fig. 3D). Además, después del daño UV, hubo ruptura en la membrana basal, pero el tratamiento de 0,1% SRHC tipo XVII podría reparar el daño de la unión dermoepidérmica (UDE) y la UDE estaba intacta (Fig.3E)

**Referencias bibliográficas**

1. Sorushanova, A., et al., *The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development*. Advanced materials, 2019. 31(1): p. 1801651.
2. Matinong, A.M.E., et al., *Collagen extraction from animal skin*. Biology, 2022. 11(6): p. 905.
3. Duan, H., et al., *New strategy for expression of recombinant hydroxylated human-derived gelatin in Pichia pastoris KM71*. Journal of agricultural and food chemistry, 2011. 59(13): p. 7127-7134.
4. Mullins, R.J., C. Richards, and T. Walker, *Allergic reactions to oral, surgical and topical bovine collagen: Anaphylactic risk for surgeons*. Australian and New Zealand journal of ophthalmology, 1996. 24(3): p. 257-260.
5. Sakaguchi, M., et al., *IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy*. Journal of allergy and clinical immunology, 2000. 106(3): p. 579-584.
6. Ricard-Blum, S., *The collagen family*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2011. 3(1): p. a004978.
7. Liu, N., et al., *Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing*. Nature, 2019. 568(7752): p. 344-350.
8. Matsumura, H., et al., *Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis*. Science, 2016. 351(6273): p. aad4395.
9. Nykvist, P., et al., *The cell adhesion domain of type XVII collagen promotes integrin-mediated cell spreading by a novel mechanism*. Journal of biological chemistry, 2001. 276(42): p. 38673-38679.
10. Idiris, A., et al., *Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production*. Applied microbiology and biotechnology, 2010. 86: p. 403-417.



SUMMIT  
COSMETICS

EUROPEAN DISTRIBUTOR  
OF COSMETIC INGREDIENTS

Active Ingredients

Natural Scrubs

Vitamins & Pure Molecules

Castor Oil Derivatives

Natural Multifunctionals

Thickening Biopolymers

Solvents

Join us at **COSMETORIUM**  
**HALL 5 - BOOTH 422**

**Summit Cosmetics Europe - German Branch**

Schwannstr. 10, 40476 Düsseldorf, Germany - +49 (0)211 4570 511

[contact-germany@summitcosmetics-europe.com](mailto:contact-germany@summitcosmetics-europe.com)

[summitcosmetics-europe.com](http://summitcosmetics-europe.com)

# BEAUTY CHAKRA

*Designed for every here and for every now*



18-19 Octubre 2023  
Barcelona  
**STAND 224**



**WORKSHOP**  
*Beauty Chakra*  
18 Octubre 2023  
h. 15.00 - 15.30



**TECHFOCUS**  
*Modelling food by-products:  
the ROELMI HPC upcycled beauty*  
18 Octubre 2023  
h. 13.30 - 13.50

**ROELMI·HPC**   
Health & Personal Care

[www.amitahc.com](http://www.amitahc.com)  
[sales.es@amitahc.com](mailto:sales.es@amitahc.com)



**SEE the future: Safety • Ethics • Eco-sustainability**

**amitahc  
Iberia**  
*A value provider*



Activos exclusivos



Formula concept



Ingredientes innovadores

## NUESTROS PARTNERS



**BiosControl®**



**Contact amitahc Iberia**

[www.amitahc.com](http://www.amitahc.com) | [sales.es@amitahc.com](mailto:sales.es@amitahc.com) | Phone: +34 936250780