

**MARIEL DOURADO ALCORTE**

**Produção em escala laboratorial e caracterização de variantes do colágeno  
tipo VII humano recombinante resistentes à clivagem por  
metaloproteinases de matriz**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação Interunidades em  
Biotecnologia da Universidade de São  
Paulo, Instituto Butantan e Instituto de  
Pesquisas Tecnológicas para obtenção  
do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo  
2019

## RESUMO

ALCORTE, M. D. **Produção em escala laboratorial e caracterização de variantes do colágeno tipo VII humano recombinante resistentes a metaloproteinases de matriz.** 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A Epidermólise Bolhosa Distrófica Recessiva (EBDR) é um distúrbio mecanobolhoso da pele causado por mutações no gene *COL7A1*, que codifica a proteína de colágeno VII (COL7A1). O fenótipo desta doença rara é caracterizado pelo aparecimento de bolhas, pela fragilidade da pele associada a pequenos traumas ou trações nos tecidos afetados, e por um processo de cicatrização de feridas incessante e mutilante. Atualmente, a EBDR não tem cura, sendo o tratamento apenas paliativo, principalmente das bolhas e infecções cutâneas. O COL7A1 é uma glicoproteína de 2.944 aminoácidos encontrada principalmente na membrana basal, sendo o componente majoritário das fibrilas de ancoragem, que são estruturas responsáveis pela promoção da aderência da derme à epiderme. Algumas opções de tratamentos para a EBDR estão sendo exploradas, dentre elas a terapia de reposição empregando o COL7A1 humano recombinante (rCOL7A1). Estudos utilizando camundongos nocaute para o gene *Col7a1* demonstraram que a aplicação tópica, injeções intradérmicas, e administração intravenosa de rCOL7A1 proporcionaram a reconstituição das fibrilas de ancoragem, e uma reversão parcial do fenótipo da EBDR. Trabalhos científicos indicam que o tempo de meia-vida do COL7A1 é de aproximadamente um mês, sugerindo uma frequência mensal de administração do rCOL7A1. A degradação do COL7A1 ocorre pela atuação das metaloproteinases de matriz 1 (MMP-1) e 2 (MMP-2), que, quando inibidas, favorecem a formação de fibrilas de ancoragem, sugerindo que a introdução de uma alteração dos sítios de clivagem do COL7A1 pelas MMP-1 ou MMP-2 proporcionaria um aumento do tempo de meia-vida das fibrilas de ancoragem. O presente trabalho de mestrado busca contribuir para a obtenção de uma opção terapêutica inédita para a EBDR, tendo como objetivo a obtenção de formas variantes de rCOL7A1 possivelmente resistentes à ação proteolítica das MMP-1 e MMP-2. Os objetivos específicos envolveram a produção em escala laboratorial, bem como a avaliação bioquímica e estrutural, de três formas variantes de rCOL7A1, putativamente resistentes à MMP-2 (COL7A1V1), à MMP-1 (COL7A1V2), e às MMP-1 e MMP-2 (COL7A1V3). Células CHO-DG44 foram transfectadas estavelmente com os vetores de expressão das formas selvagem e variantes do rCOL7A1, e submetidas ao processo de indução da amplificação gênica. Foram obtidas as linhagens celulares produzindo estavelmente o rCOL7A1 selvagem e os variantes COL7A1V1, COL7A1V2 e COL7A1V3. As proteínas produzidas foram caracterizadas por *Western blot*

demonstrando a integridade estrutural da forma monomérica e a capacidade de formação da forma trimérica *in vitro*. Os resultados obtidos constituem os primeiros passos para a caracterização bioquímica mais detalhada das formas variantes de rCOL7A1 potencialmente resistentes à degradação mediada pelas MMP1 e MMP2.

**Palavras chaves:** Colágeno. Colágeno VII recombinante. Epidermólise bolhosa distrófica recessiva. Proteínas recombinantes. Variantes do rCOL7A1.

## ABSTRACT

ALCORTE, M. D. **Laboratory scale production and characterization of variants of recombinant human type VII collagen resistant to matrix metalloproteinases cleavage.** 2019. 79 f. Dissertation (Master thesis in Biotechnology program) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Recessive Dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is a mechanobullous skin disorder caused by mutations in the *COL7A1* gene encoding the protein collagen VII (COL7A1). The phenotype of this rare inherited disease is characterized by blistering and skin fragility associated with minor trauma or friction in affected tissues and by an unceasing and mutilating wound healing process. Currently, RDEB has no cure, and treatment is only palliative, aiming especially at dealing with blistering and skin infections. COL7A1 is a glycoprotein of 2,944 amino acids found mainly in the basement membrane, being the major component of the anchoring fibrils, responsible for the attachment between the dermis and the epidermis. Some alternative treatment options are being explored, including replacement therapy with human recombinant COL7A1 (rCOL7A1). Studies employing knockout mice for the *Col7a1* gene demonstrated that the topical, intradermal injections and intravenous administration of rCOL7A1 enabled the reconstitution of anchoring fibrils, and a partial phenotypic reversal of RDEB phenotype. Scientific works disclose the COL7A1 half-life as approximately one month, suggesting that the administration frequency of rCOL7A1 would be once a month. The degradation of COL7A1 occurs through the action of matrix metalloproteinases 1 (MMP-1) and 2 (MMP-2), which, when inhibited, facilitate the formation of anchoring fibrils, suggesting that changing the COL7A1's MMP-1 or MMP-2 cleavage sites would increase the half-life of the anchoring fibrils. This project aims at contributing to the establishment of a novel therapeutic option for RDEB having as the main Objective the obtaining of rCOL7A1 variants forms possibly resistant to proteolysis mediated by MMP-1 and MMP-2. The specific Objectives involved the laboratory scale production, as well as the biochemical and structure evaluation, of three rCOL7A1 variants putatively resistant to the action of metalloproteinases MMP-2 (COL7A1V1), MMP-1 (COL7A1V2), and both MMP-1 and MMP-2 (COL7A1V3). The CHO-DG44 cells were stably transfected with the expression vectors of the wild-type and variant forms of rCOL7A1 and submitted to the induction of the gene amplification process. We obtained cell lines stably producing rCOL7A1 and its variants COL7A1V1, COL7A1V2 and COL7A1V3. The proteins were characterized by Western blot demonstrating monomer structural integrity and ability to form rCOL7A1 homotrimer *in vitro*. The results obtained

constitute the first steps for the more detailed biochemical characterization of rCOL7A1 variants potentially resistant to MMP1- and MMP2-induced degradation.

**Key words:** Collagen VII. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Recombinant collagen. Recombinant protein. Variants forms of rCOL7A1.

# 1 INTRODUÇÃO

O projeto que originou esta dissertação foi desenvolvido no Núcleo de Apoio à Pesquisa (NAP) NUCEL/NETCEM (Núcleo de Terapia Molecular e Celular), vinculado à Faculdade de Medicina da USP. O centro de pesquisa apresenta como uma de suas quatro linhas de pesquisa o desenvolvimento de linhagens celulares produtoras de proteínas recombinantes de interesse terapêutico e biotecnológico. A partir de uma demanda externa ao grupo de pesquisa, os integrantes do NUCEL formaram um grupo trabalho para avaliar o cenário do desenvolvimento de tratamentos para a doença epidermólise bolhosa distrófica recessiva, para a qual não há cura. Foi no contexto das possibilidades analisadas que este projeto foi elaborado.

## 1.1 Epidermólise bolhosa: Aspectos clínicos e moleculares, diagnóstico e prevalência

A epidermólise bolhosa (EB) é um grupo de doenças mecanobolhosas hereditárias de pele, caracterizado pela fragilidade da pele, associado à formação de bolhas a partir de pequenos traumas ou tração. As mutações genéticas presentes no gene que codifica o colágeno tipo VII (*COL7A1*) são as mais comumente associadas à EBD (2). As alterações genéticas são autossômicas recessivas ou dominantes, e interferem com a principal função do *COL7A1*, que é participar da estrutura de fixação da epiderme à derme por meio das fibrilas de ancoragem, um complexo supramolecular formado a partir da associação ordenada de trímeros de *COL7A1*. A disfunção do *COL7A1* acarreta na falta de aderência entre a derme e epiderme (3). As características clínicas da EBD são variáveis entre os pacientes e entre os subtipos, sendo que no subtipo recessivo (EBDR) os sintomas são mais severos. Os portadores de EBD apresentam bolhas localizadas nas extremidades como pés, mãos, cotovelos e joelhos, ou disseminadas por toda a extensão do corpo, além de unhas ausentes ou deformadas e dentes malformados. O processo de cicatrização nestes indivíduos também é aberrante, caracterizado por ser um processo incessante e mutilante. As lesões na pele formam cicatrizes que reduzem os movimentos, e originam a fusão dos dedos, denominada pseudosindactilia, e contraturas musculares (3). Os pacientes podem também ser acometidos por lesões nas mucosas de todo o trato gastrointestinal, que por sua vez limitam a absorção dos alimentos causada pelas dores ao engolir, dificuldade de mastigação, culminando em má nutrição crônica, retardo no crescimento

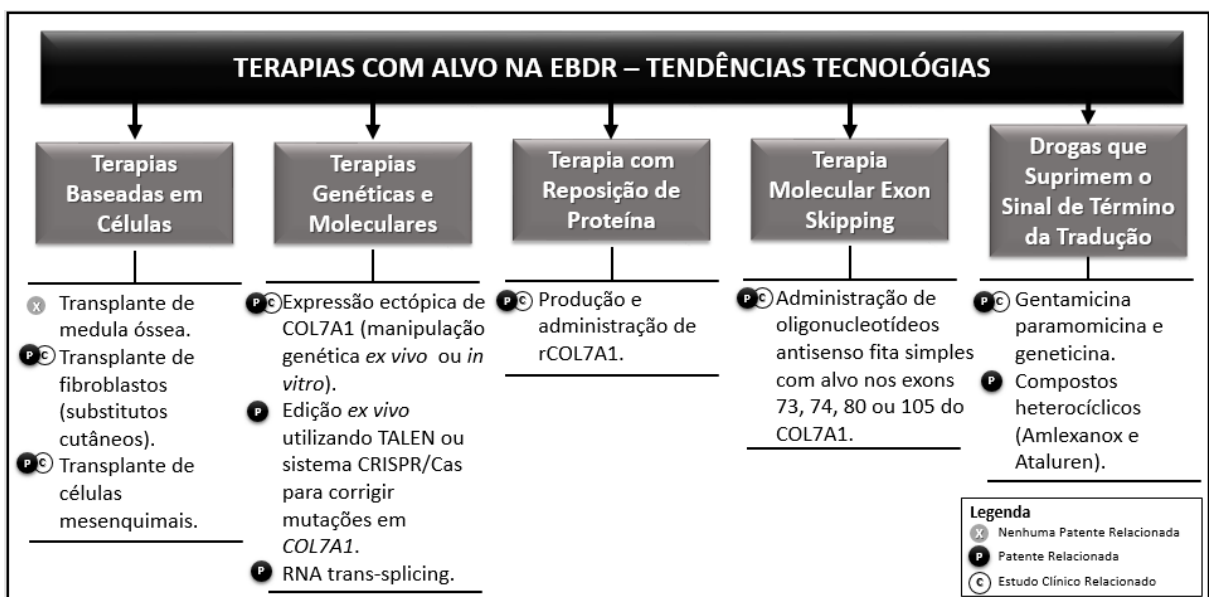
e anemia (3). Na EBDR há maior suscetibilidade do indivíduo apresentar carcinoma de células escamosas (3,4). Mais de 800 mutações no gene *COL7A1* já foram identificadas em pacientes com EBD (5).

Na Europa, estimou-se a prevalência da EBD em aproximadamente 2,8 em 1.000.000 indivíduos sendo a doença classificada como rara (6,7). No Brasil as doenças raras tornaram-se reconhecidas pela política de saúde pública com a implementação da portaria número 199 de 30 de janeiro de 2014. A aplicação das diretrizes políticas se iniciou com a priorização das enfermidades, na qual a EBD não foi contemplada até o momento.

## 1.2 Tratamento da EBD

A EBDR não tem cura, e atualmente o tratamento é apenas capaz de realizar o manejo dos sintomas da EBD, limitando-se a controlar as infecções e proporcionar alguma qualidade de vida aos pacientes (8). O desenvolvimento de tratamentos, que buscam a correção genética e reversão do fenótipo demonstrado na figura 1, está em curso nos últimos 20 anos, e lentamente estão sendo transpostos para estudos clínicos.

Figura 1- Panorama das terapias-alvo para a EBDR com promissor potencial terapêutico (9)



Alcorte et al, 2019 modificado.

As estratégias de terapia-alvo para EBDR envolvem a) o emprego de terapia celular, como, por exemplo, o transplante alogênico de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea precedido pela ablação da medula óssea do paciente (10) ou transplante de fibroblastos alogênicos; b) a terapia gênica por meio da manipulação genética *ex vivo* de células do paciente para a inserção de uma cópia funcional do minigene recombinante de COL7A1 utilizando vetores virais (11,12), ou utilizando técnicas de edição gênica envolvendo a utilização de nucleases sítio-específicas com a TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) (13,14) ou CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated proteins 9) (15,16) seguida pela indução do processo de recombinação homóloga no sítio de clivagem; c) a terapia de reposição utilizando o rCOL7A1 (17–21); d) terapias moleculares baseadas nos fenômenos de “exon skipping” e “trans-splicing” mediados por oligonucleotídeos sintéticos (22,23); e e) estratégias farmacogenômicas baseadas em drogas que suprimem o sinal de término da tradução associados a códons de parada prematuros (24).

A ablação quimioterápica da medula óssea seguida pelo transplante de medula ou de células-tronco mesenquimais derivadas da medula, em humanos, demonstrou a ocorrência de migração de células-tronco para a derme, onde as mesmas se diferenciam em queratinócitos, proporcionando a produção local de COL7A1. (10,25). Alternativamente, a utilização de injeção de fibroblastos alogênicos cultivados *in vitro* alcançou benefícios semelhantes, porém, de forma localizada (26,27).

Outra modalidade de terapia-alvo que vem sendo avaliada, a terapia gênica, consiste em utilizar células do próprio paciente, como células-tronco, células mesenquimais ou células diferenciadas como queratinócitos, fibroblastos ou linfócitos. Inicialmente as células do paciente são cultivadas *in vitro*, passam por manipulação genética *ex vivo*, posteriormente são expandidas e caracterizadas, e então transplantadas no paciente (13–16).

Adicionalmente, tem-se explorado modalidades de terapias moleculares baseadas nos fenômenos de “exon skipping” e “trans-splicing” as quais podem ser aplicadas para se evitar a utilização de exons do gene *COL7A1* contendo mutações (“exon skipping”) ou para promover a substituição de porções do mRNA do *COL7A1* contendo mutações pelas porções correspondentes contendo a sequência selvagem do *COL7A1* (“trans-splicing”) (22,23). No caso da estratégia envolvendo o “exon skipping”, utiliza-se oligonucleotídeos antisense fita-simples sintéticos que se ligam ao pré-mRNA e promovem o “splicing” de determinado exon



(23). No caso da estratégia envolvendo o “trans-splicing”, empregam-se moléculas de RNA exógenas que possuem elementos que promovem o “trans-splicing” entre segmentos específicos do mRNA-alvo e do RNA exógeno, promovendo desta forma a substituição da sequência contendo a mutação (22).

No caso particular de mutações do tipo nonsense no gene *COL7A1*, as quais originam terminações prematuras e conseqüentemente a produção de uma proteína truncada de COL7A1, tem-se explorado drogas que suprimem o sinal de término da tradução, como os antibióticos aminoglicosídeos, com resultados promissores (24).

Outra opção terapêutica ainda em fase experimental é a terapia de reposição envolvendo a administração do rCOL7A1. Em modelos murinos nocaute para o gene *Col7a1*, a incorporação do rCOL7A1 na camada basal da junção derme-epiderme promoveu a reversão das características fenotípicas da EBDR, restaurando a formação das fibrilas de ancoragem, e a adesão entre derme e epiderme (17). Demonstrou-se que a injeção intradérmica do rCOL7A1 pode ser utilizada para reverter as alterações clínicas da EBDR, contudo não foi observado a distribuição difusa do rCOL7A1 através da derme (17,18). Adicionalmente, avaliou-se a possibilidade de aplicação tópica do rCOL7A1 como uma alternativa adicional de tratamento das alterações cutâneas associadas à EBDR, o que proporcionou uma aceleração do processo de cura das feridas (19). Woodley e colaboradores demonstraram que mesmo após a administração intravenosa, o rCOL7A1 é capaz de migrar para as áreas afetadas na EBDR, restaurando as fibrilas de ancoragem e a aderência entre a derme e epiderme, e abrindo, desta forma, a possibilidade de se estabelecer um tratamento sistêmico para a EBDR (19).

A terapia de reposição através da administração intravenosa do rCOL7A1 apresenta algumas vantagens importantes. Em relação às terapias gênica e celular apresenta: a) o potencial de se tratar, simultaneamente, múltiplas áreas afetadas da pele e as membranas mucosas. No caso das terapias gênica ou celular este mesmo efeito seria possível apenas através da administração sistêmica de células autólogas geneticamente modificadas, ou de células-tronco hematopoiéticas; e b) existe uma longa experiência acumulada quanto à segurança envolvendo a produção e utilização clínica de proteínas recombinantes humanas terapêuticas (biofármacos), sendo que o produto final não envolve a presença de partículas virais ou células vivas, o que é uma grande vantagem em termos de biossegurança e, conseqüentemente, para a aprovação pela agências regulatórias. Além destas vantagens em relação às terapias gênica e celular, existem outras características que fazem da administração sistêmica do rCOL7A1 uma alternativa muito

atrativa: a) a possibilidade de intervenção terapêutica tão logo o diagnóstico de EBDR tenha sido confirmado e testes de imunotolerância ao rCOL7A1 tenham sido realizados, sendo que a intervenção terapêutica precoce teria o potencial de prevenir complicações graves associadas à EBDR, como, por exemplo, fusão (pseudosindactilia) e contração dos dedos, e o estreitamento (estenose) do esôfago; e b) a indicação de terapia de reposição através da utilização do rCOL7A1 independe da natureza ou localização das mutações no gene COL7A1, e, desta forma, poder ser aplicada a todos os pacientes da EBDR, desde que esses pacientes não desenvolvam uma resposta imunológica ao rCOL7A1.

A produção do rCOL7A1 foi iniciada em 1994 com intuito de investigar os epítomos associados à EB adquirida (28). Porém, foi somente a partir de 2004 que a utilização do rCOL7A1 começou a ser explorada como uma alternativa de tratamento da EBDR. Woodley e colaboradores demonstraram que, através de injeção intradérmica, o rCOL7A1 se difunde até a derme, e é incorporado à membrana basal, formando as fibrilas de ancoragem (18). Em 2009, Remington e colaboradores complementaram estes achados através da observação de que a injeção intradérmica do rCOL7A1 era capaz de reverter parcialmente o fenótipo de EBDR em modelos murinos, contudo, a administração local de rCOL7A1 através de injeção intradérmica limitava a sua ação a locais próximos à sua aplicação (17). Em 2013, foram exploradas as administrações tópica e intravenosa do rCOL7A1. Esta última demonstrou ser uma opção muito promissora, permitindo que o tratamento de reposição com o rCOL7A1 fosse realizado de forma sistêmica, pois, através de mecanismos ainda não caracterizados, parte do rCOL7A1 acaba sendo direcionado e incorporado à membrana basal, proporcionando uma reversão do fenótipo nas áreas afetadas (19,20). Atualmente, o rCOL7A1 não é oferecido comercialmente como uma opção terapêutica para tratamento da EBDR, estando em fase 1 de estudo clínico (29).

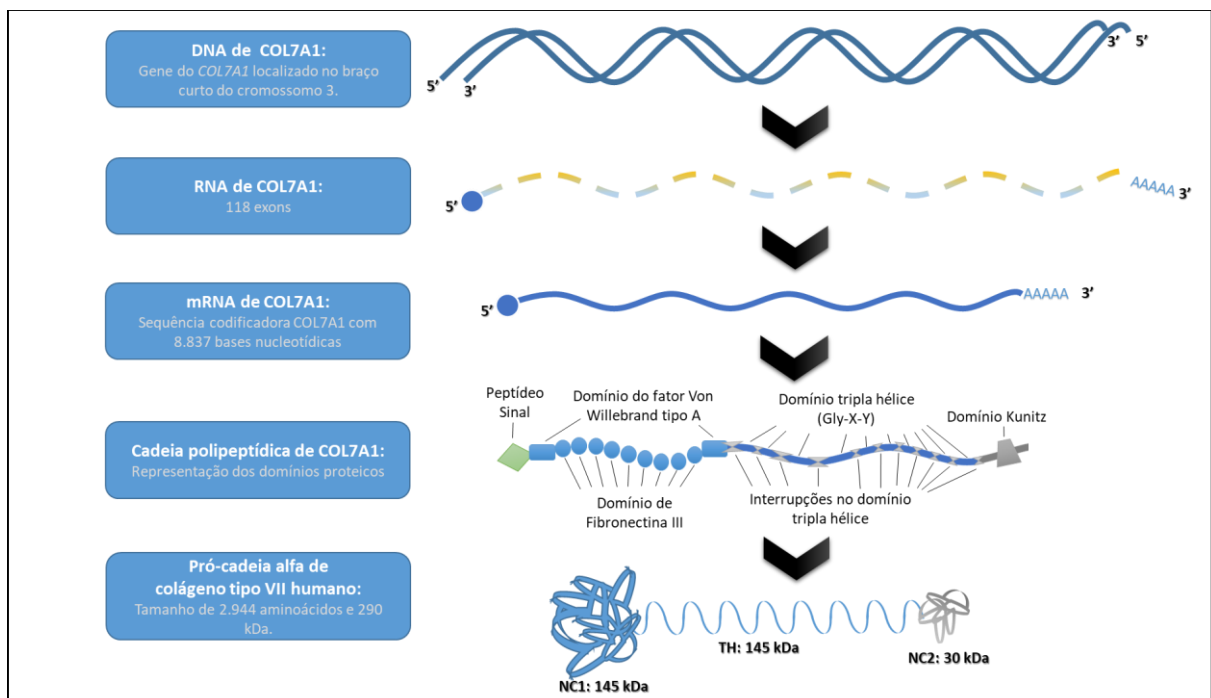
### **1.3 COL7A1: estrutura e função**

O COL7A1 é uma glicoproteína encontrada principalmente na membrana basal, sendo o componente majoritário das fibrilas de ancoragem, responsáveis pela adesão entre a derme e epiderme (3). Assim como todos os outros colágenos, apresenta a notável repetição da sequência de aminoácidos Gly-X-Y, onde X é geralmente uma prolina e Y a 4-hidroxiprolina.

O rCOL7A1 possui algumas interrupções na sequência Gly-X-Y, que fornece à molécula certa flexibilidade e sensibilidade às clivagens proteolíticas (30). Tais características estruturais, aliadas a outras descritas mais adiante, conferem especificidades à sua atividade biológica distintas das observadas para outros colágenos (3,30).

O gene *COL7A1* está localizado no braço curto do cromossomo 3, e codifica um polipeptídeo precursor de 2.944 resíduos, cuja expressão é detectada principalmente em queratinócitos e fibroblastos da derme (3). Estruturalmente, o COL7A1 é formado por hélices  $\alpha$  centrais com domínios terminais não colagenosos, NC1 e NC2 (Figura 2). O domínio central da porção hélice  $\alpha$ , de 1.530 resíduos, apresenta 19 interrupções na sequência Gly-X-Y, além de apresentar 39 resíduos não colagenosos, conferindo à molécula uma espécie de dobradiça suscetível à digestão proteolítica por pepsina (3,31). O domínio amino-terminal NC1 de 145 kDa apresenta afinidade às proteínas da membrana basal, como as lamininas e colágeno IV. O domínio carboxi-terminal NC2 é relativamente pequeno, 30 kDa, e contém segmento homólogo à molécula inibitória da protease Kunitz (3,30).

Figura 2- Representação da fita dupla de DNA, RNA, mRNA, cadeia polipeptídica precursora e proteína madura do colágeno tipo VII humano (COL7A1).



Na cadeia polipeptídica precursora de COL7A1 estão ilustrados os domínios proteicos, e na pró-cadeia alfa de colágeno tipo VII humano (proteína madura) estão demonstradas as regiões não colagenosa 1 (NC1), tripla hélice (TH) e não colagenosa 2 (NC2), e suas respectivas massas moleculares.

As cadeias polipeptídicas individuais de colágeno, denominadas pró-cadeia  $\alpha$ , são sintetizadas pelos ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático (RE), e translocadas para o lúmen do RE como precursores iniciais. No lúmen do RE, parte das prolinas e lisinas das cadeias polipeptídicas são hidroxiladas, e algumas hidroxilinas são glicosiladas (32). Cada cadeia monomérica de 290 kDa se combina com outras duas cadeias idênticas para formar uma molécula helicoidal de três fitas, e o homotrímero resultante é estabilizado por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas dos resíduos de prolina e lisina modificados pós-traducionalmente, possuindo massa molecular de 900 kDa (31).

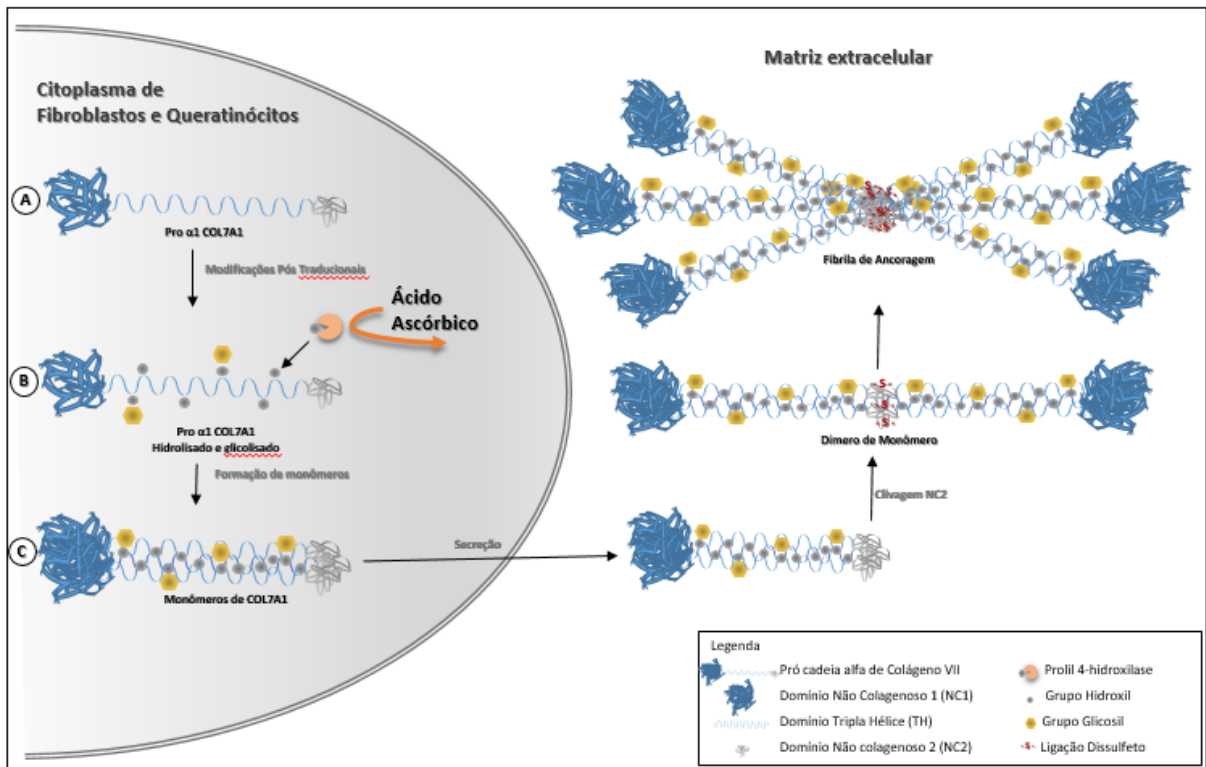
A alteração das prolinas da porção helicoidal, por intermédio da prolil 4-hidroxilase (P4H), em hidroxiprolinas favorece formação de ligação de hidrogênio entre as três cadeias idênticas de COL7A1 (33), aumentando a estabilidade do homotrímero. A P4H pertence à família das deoxigenases dependentes de  $\alpha$ -cetoglutarato e íons ferro II não conjugados ao grupo heme. Para o ciclo catalítico, a P4H utiliza uma molécula de oxigênio,  $\alpha$ -cetoglutarato e Fe<sup>2+</sup>. Após a reação, a renovação da P4H é intermediada pelo ácido ascórbico, que por sua vez promove a redução do ferro III no estado inativo a ferro II no estado ativo (33). O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é usualmente adicionado ao meio de cultivo de células produtoras de colágeno para o aumento da produção do trímero de colágeno (34). Contudo o ácido ascórbico apresenta estabilidade dependente dos componentes do meio de cultivo, e os produtos de degradação da vitamina C geram um ambiente não favorável à sobrevivência celular (35).

Após a secreção do homotrímero de colágeno, os domínios NC2 são removidos por enzimas proteolíticas extracelulares específicas, e o homotrímero de COL7A1 se condensa, de forma ordenada, a outros homotrímeros de COL7A1, formando as fibrilas de ancoragem. Além disso, os domínios NC1 e NC2 guiam a formação intracelular dos homotrímeros, e previnem a formação intracelular de grandes fibrilas de colágeno (30,32).

A formação das fibrilas de ancoragem se inicia próximo à superfície celular, nos profundos bolsos da membrana plasmática, e é dirigida, em parte, pela baixa solubilidade dos homotrímeros de colágeno VII ainda contendo os domínios NC1 e NC2, e, adicionalmente, pelo citoesqueleto cortical subjacente. Inicialmente, ocorre a formação de dímeros antiparalelos, ligados cauda-a-cauda, e estabilizados por ligações dissulfeto intermoleculares no domínio NC2. O domínio NC2 é removido através de uma clivagem proteolítica mediada pela BMP-1 (Bone Morphogenetic Protein-1), e os dímeros se posicionam lateralmente,

formando as fibrilas de ancoragem, com um grande domínio globular em cada extremidade, e que interagem com a membrana basal. Posteriormente, ocorre a associação lateral dos dímeros às fibrilas (30–32,36). As fibrilas são reforçadas pela formação de ligações covalentes cruzadas entre as lisinas das moléculas de colágeno (32) (Figura 3).

Figura 3 - Representação da formação da fibrila de ancoragem a partir da pró-cadeia alfa de colágeno tipo VII humano .



Alcorte *et al*, 2019 modificado.

A biossíntese das fibrilas de ancoragem ilustrada demonstra a forma monomérica e homotrimérica do COL7A1 no meio intracelular, as modificações pós-traducionais, a secreção do homotrímero e a formação da fibrila de ancoragem no ambiente extracelular (9).

A biodegradação proteolítica dos colágenos pode ocorrer tanto em sítios situados nos segmentos tripla hélice, bem como em segmentos não helicoidais. Apenas a digestão proteolítica nos segmentos tripla-hélice resulta na desnaturação da tripla-hélice em temperatura fisiológica. As enzimas proteolíticas capazes de clivar sítios nos segmentos tripla-hélice dos colágenos são conhecidas como colagenases, as quais pertencem à família de endopeptidases das metaloproteinases de matriz (MMP – Matrix Metalloproteinases). Os fragmentos de colágeno gerados após a clivagem pelas colagenases sofrem desnaturação espontânea em

derivados não-helicoidais, os quais são susceptíveis à clivagem por outras classes de proteases (37).

A utilização de colágeno em pesquisas científicas e em biomateriais foi viabilizada pelo desenvolvimento de metodologias de extração de colágeno a partir de fontes animais bovinas, porcinas e marinhas. O uso de colágeno exigiu um aumento na produtividade, redução na variação entre lotes, redução da reatividade imunogênica e a não utilização de materiais derivados de animais, principalmente o bovino. Desta forma, plataformas de expressão de colágeno recombinante estão sendo exploradas, como bactérias, leveduras, células de mamíferos e células de inseto (34). Os maiores desafios na produção de colágeno humano recombinante compreendem o aumento de produção e inserção de alterações pós-traducionais em quantidades satisfatórias. A utilização de células de mamífero para a produção do colágeno recombinante é a melhor opção referente às alterações pós-traducionais, porém precisa de otimizações para o aumento de produção (34).

#### **1.4 A proposta do trabalho**

A biofarmacêutica Phoenix Tissue Repair está desenvolvendo, a partir de plataforma de expressão baseada em células derivadas de hamster chinês CHO, o rCOL7A1 para o tratamento da EBDR, e que atualmente se encontra em fase de estudos pré-clínicos (19–21,38). As células CHO são amplamente utilizadas para a produção industrial de biofármacos, pois possui maquinaria celular suficiente para realizar modificações pós-traducionais complexas, como a glicosilação (39). Embora exista a necessidade de testes adicionais para se avaliar o tempo de meia-vida tecidual do rCOL7A1, dados da literatura indicam que é possível detectar baixos níveis de rCOL7A1 na língua e no esôfago até 5 meses após uma única administração intravenosa do rCOL7A1 em camundongos nocaute para o gene *Col7a1* (21). Outros estudos utilizando estes mesmos animais indicam que o rCOL7A1 persiste na junção derme-epiderme da pele por até 2 meses quando administrado intradermicamente (17). Entretanto, a mediana de sobrevivência dos animais administrados intravenosamente com uma única dose de rCOL7A1 é de 12 dias (21), enquanto que em animais administrados diariamente via intradérmica na primeira semana de tratamento, e semanalmente nas semanas subsequentes, a mediana de sobrevivência é de 5 semanas (18,19). Estes dados, e outros informais da Phoenix Tissue

Repair, biofarmacêutica que vem desenvolvendo o rCOL7A1, indicam que, embora o colágeno VII seja uma proteína estável e com baixa taxa de renovação (turnover), a frequência de administração do rCOL7A1 teria que ser mensal.

O mecanismo de renovação das fibrilas de ancoragem ainda não está bem elucidado, mas recentemente Kühl e colaboradores identificaram em modelo murino nocaute para *Col7a1* induzido por tamoxifeno que o tempo de meia vida do colágeno é de um mês (38). A degradação do COL7A1 ocorre pela atuação das metaloproteinases de matriz 1 (MMP1) (40,41), 2 (MMP2) (31,40) e 3 (MMP3) (41). As MMPs são endopeptidases zinco-dependentes, e estão envolvidas com o remodelamento da matriz extracelular, conduzindo processos fisiológicos e patológicos (42). Em modelo de pele equivalente, demonstrou-se que a atuação de inibidores de metaloproteinases de matriz, como MMI270 e inibidor 1 de MMPs, proporcionam o depósito de COL7A1 favorecendo a formação de fibrilas de ancoragem (43,44). Estes dados conduzem ao pressuposto que a introdução de alteração no sítio de clivagem do COL7A1 por metaloproteinases proporcionaria o aumento do tempo de meia-vida das fibrilas de ancoragem na junção derme-epiderme por meio da redução do reconhecimento e atuação das metaloproteinases de matriz sobre o COL7A1.

O objetivo da presente trabalho de mestrado foi obter, através da síntese artificial de trechos da região codificadora do rCOL7A1, um variante do rCOL7A1 mais resistente a ação das colagenases, e, conseqüentemente, com uma meia-vida tecidual mais prolongada em relação a forma selvagem do rCOL7A1, o que poderia proporcionar uma redução da frequência de administrações.

A especificidade das MMPs frente aos diferentes colágenos parece ser ditada por uma combinação do reconhecimento de sequências polipeptídicas primárias específicas no substrato, e a exposição de sítios de clivagem determinados relacionada a estabilidade térmica dos domínios de tripla hélice dos diferentes colágenos (45). Apesar de cada molécula de colágeno possuir múltiplos sítios potenciais de clivagem pelas MMPs, a clivagem ocorre em sítios bem definidos, aparentemente em regiões com relativamente poucas repetições Gly-X-Y (46). Foi justamente a caracterização do sítio específico de clivagem promovida pela MMP1, no caso do colágeno tipo I, que permitiu a geração de um variante do colágeno tipo I resistente à colagenases (47,48). A intensidade de catálise das MMPs requer ainda algumas peculiaridades na sequência primária dos colágenos, entre elas a presença de resíduos de aminoácidos específicos no sítio S1' do substrato (49).

A escolha dos resíduos de aminoácidos que foram alterados na sequência polipeptídica do rCOL7A1 se baseou em evidências experimentais diretas e consolidadas indicando que as MMP1 e MMP2 clivam o colágeno em sítios específicos e independentes na região tripla hélice (31,40). Estes sítios foram mapeados categoricamente através da caracterização das sequências N-terminais, obtidas por sequenciamento proteico por degradação de Edman, dos fragmentos proteicos gerados a partir da clivagem do COL7A1 pelas MMP1 e MMP2, empregando-se o COL7A1 extraído e purificado de placenta humana (40). A clivagem proteolítica promovida pelas MMPs ocorre entre os resíduos de glicina e leucina, ou glicina e isoleucina. O alinhamento da sequência do COL7A1 depositada no Genbank com as duas sequências proteicas identificadas por Seltzer e colaboradores permitiu a identificação da posição dos aminoácidos glicina (G) e leucina (L) no COL7A1 G2031-L2032 e G2079-L2080 pertencentes aos sítios de clivagem pelas MMP-2 e 1, respectivamente. Os resultados de Chen e colaboradores, em 2002, corroboram a especificidade do sítio de clivagem pela MMP2 através da caracterização do fragmento de 120 kDa gerado como produto de clivagem *in vitro* do COL7A1 recombinante pela MMP2 (31). Não há evidências consolidadas de clivagem do COL7A1 pela MMP3, apenas uma única evidência direta, descrita por Sawamura e colaboradores, mas que é baseada em ensaios de clivagem *in vitro* empregando preparações proteicas nas quais não é possível se atestar a identidade do COL7A1 nem mesmo das MMPs empregadas (41).

Quanto ao possível impacto da introdução destas mutações na estabilidade do COL7A1, a substituição do aminoácido leucina por alanina nas posições 2032 e 2080, correspondentes ao sítio S1' de clivagem do COL7A1 na região de tripla hélice pelas MMPs 2 e 1 respectivamente, aparentemente não interfeririam com os principais fatores que conferem estabilidade à tripla hélice, que seriam a presença da glicina a cada três aminoácidos e a presença de elevado conteúdo de prolinas e hidroxiprolinas. A repetição Gly-X-Y apresenta, de forma minoritária, outros aminoácidos nas posições X e Y. O aminoácido alanina a ser inserido, assim como a leucina, a ser substituído, são aminoácidos apolares e naturalmente encontrados no domínio tripla-hélice do COL7A1. Além disso, mais de 800 mutações no COL7A1 foram identificadas nos pacientes portadores de epidermólise bolhosa distrófica (EBD) (5) e as bases nucleotídicas que serão alteradas não estão descritas nas bases de dados contendo as mutações associadas à EBDR (50). Assim, não se espera que a inserção destas mutações venha conferir uma instabilidade estrutural ao rCOL7A1 ou suscetibilidade adicional a degradação proteolítica das formas variantes do rCOL7A1 durante o seu trânsito na rota secretória, ou mesmo no meio de cultura, após a sua secreção.



Desta forma, baseando-se no conhecimento da especificidade das MMPs e nos fatores que conferem estabilidade ao COL7A1, a nossa proposta se baseia na alteração do aminoácido "S1", no caso a substituição do resíduo de leucina para uma alanina, nos sítios de clivagem do COL7A1 pelas MMP1 e MMP2, por síntese artificial de trechos da região codificadora do rCOL7A1, e assim modificar o sítio de clivagem reconhecido pelas colagenases, proporcionando a redução do seu reconhecimento pelas MMPs.

## 6 CONCLUSÃO

- Foi obtida a linhagem CHO-DG44-COL7A1 resistente à 30 nM de MTX produtora de rCOL7A1;

- O homotrímero de rCOL7A1 pode ser obtido a partir da adição única de 50 ug/ml de ácido ascórbico no meio condicionado das células CHO-DG44-COL7A1 resistente à 30 nM de MTX e nas células 293T;

- A observação da presença de homotrímero de rCOL7A1, associada com a suplementação de ácido ascórbico no meio de cultivo, atesta a funcionalidade preliminar da molécula recombinante obtida em gerar a estrutura trimérica, inicialmente fundamental para sua atividade biológica;

- Foram obtidas as linhagens CHO-DG44-COL7A1V1, CHO-DG44-COL7A1V2 e CHO-DG44-COL7A1V3 resistentes à 30 nM de MTX produtoras de rCOL7A1V1, rCOL7A1V2 e rCOL7A1V3 apresentando as mutações que teoricamente conferem resistência às metaloproteinases de matriz I e II.

- As formas variantes do rCOL7A1 rCOL7A1V1, rCOL7A1V2 e rCOL7A1V3 são capazes de se associar na forma de homotrímeros, indicando a manutenção desta característica funcional preliminar e individual das formas variantes de rCOL7A1.

- As linhagens celulares de produtoras de rCOL7A1 selvagem e das formas variantes rCOL7A1V1, rCOL7A1V2 e rCOL7A1V3 produzem as proteínas de interesse em baixa quantidade e a detecção destas proteínas por meio de Western blot está associada outras proteínas com massas moleculares diversas.

- O ensaio de Western blot revelou que a produção de rCOL7A1 e das formas variantes rCOL7A1V1, rCOL7A1V2 e rCOL7A1V3 apresentam moléculas reativas ao anticorpo antiCOL7A1 com massas moleculares que não são de interesse e que podem corresponder à fragmentos degradados de rCOL7A1 devido instabilidade térmica ou instabilidade a proteases e/ou proteínas truncadas.

## BIBLIOGRAFIA<sup>1</sup>

1. Einstein A. Como vejo o mundo. Nova Fronteira; 1981. 90 p.
2. Fine J-D, Eady RAJ, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol.* 2008 Jun;58(6):931–50.
3. Dang N, Murrell DF. Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol.* Blackwell Publishing Ltd; 2008 Jul 1;17(7):553–68.
4. Fine J. Inherited epidermolysis bullosa: recent basic and clinical advances. *Curr Opin Pediatr.* Current Opinion in Pediatrics; 2010 Aug 1;22(4):453–8.
5. HGMD® gene result [Internet]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=COL7A1>
6. Hernandez-Martín A, Aranegui B, Escámez MJ, de Lucas R, Vicente A, Rodríguez-Díaz E, et al. Prevalence of Dystrophic Epidermolysis Bullosa in Spain: A Population-Based Study Using the 3-Source Capture–Recapture Method. Evidence of a Need for Improvement in Care. *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(10):890–6.
7. Cavazza A, Mavilio F. Gene Therapy of Skin Adhesion Disorders (Mini Review). *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:1868–76.
8. Britto A, Nunes O, Hirai S, Lazarini P, Fagundes MJ, Simões M. Doenças Raras: Contribuições para uma Política Nacional. *Interfarma - Assoc da Ind Farm Pesqui.* 2013;V.
9. Dourado Alcorde M, Sogayar MC, Demasi MA. Patent landscape of molecular and cellular targeted therapies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Expert Opin Ther Pat.* Taylor & Francis; 2019 May 4;29(5):327–37.
10. Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Hordinsky M, Keene DR, Woodley DT, et al. Bone Marrow Transplantation for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society ; 2010 Aug 12;363(7):629–39.
11. Rashidghamat E, McGrath JA. Novel and emerging therapies in the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Intractable Rare Dis Res.* 2017 Feb;6(1):6–20.
12. Siprashvili Z, Nguyen NT, Gorell ES, Loutit K, Khuu P, Furukawa LK, et al. Safety and Wound Outcomes Following Genetically Corrected Autologous Epidermal Grafts in Patients With Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *JAMA* 2016 Nov 1;316(17):1808.
13. Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, et al. TALEN-

---

<sup>1</sup> De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>

- based Gene Correction for Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther.* Cell Press; 2013 Jun 1;21(6):1151–9.
14. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2013 Jan 21;14(1):49–55.
  15. Izmiryan A, Ganier C, Bovolenta M, Schmitt A, Mavilio F, Hovnanian A. Ex Vivo COL7A1 Correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Using CRISPR/Cas9 and Homology-Directed Repair. *Mol Ther Nucleic Acids.* American Society of Gene & Cell Therapy; 2018 Sep 7;12:554–67.
  16. Yang L, Mali P, Kim-Kiselak C, Church G. CRISPR-Cas-Mediated Targeted Genome Editing in Human Cells. In *Humana Press*, Totowa, NJ; 2014. p. 245–67.
  17. Remington J, Wang X, Hou Y, Zhou H, Burnett J, Muirhead T, et al. Injection of Recombinant Human Type VII Collagen Corrects the Disease Phenotype in a Murine Model of Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther.* 2009 Jan;17(1):26–33.
  18. Woodley DT, Keene DR, Atha T, Huang Y, Lipman K, Li W, et al. Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Med.* Nature Publishing Group; 2004 Jul 13;10(7):693–5.
  19. Wang X, Ghasri P, Amir M, Hwang B, Hou Y, Khilili M, et al. Topical Application of Recombinant Type VII Collagen Incorporates Into the Dermal–Epidermal Junction and Promotes Wound Closure. *Mol Ther.* 2013;21(7):1335–44.
  20. Woodley DT, Wang X, Amir M, Hwang B, Remington J, Hou Y, et al. Intravenously Injected Recombinant Human Type VII Collagen Homes to Skin Wounds and Restores Skin Integrity of Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol.* 2013 Jul;133(7):1910–3.
  21. Hou Y, Guey LT, Wu T, Gao R, Cogan J, Wang X, et al. Intravenously Administered Recombinant Human Type VII Collagen Derived from Chinese Hamster Ovary Cells Reverses the Disease Phenotype in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Mice. *J Invest Dermatol.* 2015;135(12):3060–7.
  22. Peking P, Koller U, Duarte B, Murillas R, Wolf S, Maetzig T, et al. An RNA-targeted therapy for dystrophic epidermolysis bullosa. *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press; 2017 Sep 29;45(17):10259–69.
  23. Goto M, Sawamura D, Nishie W, Sakai K, McMillan JR, Akiyama M, et al. Targeted Skipping of a Single Exon Harboring a Premature Termination Codon Mutation: Implications and Potential for Gene Correction Therapy for Selective Dystrophic Epidermolysis Bullosa Patients. *J Invest Dermatol.* Elsevier; 2006 Dec 1 126(12):2614–20.
  24. Woodley DT, Cogan J, Hou Y, Lyu C, Marinkovich MP, Keene D, et al. Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Clin Invest.* 2017 Jul 10;127(8):3028–38.
  25. Tamai K, Uitto J. Stem Cell Therapy for Epidermolysis Bullosa—Does It Work? *J Invest Dermatol.* Elsevier; 2016 Nov 1;136(11):2119–21.
  26. Wong T, Gammon L, Liu L, Mellerio JE, Dopping-Hepenstal PJC, Pacy J, et al. Potential

- of Fibroblast Cell Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol.* 2008 Sep;128(9):2179–89.
27. Petrof G, Martinez-Queipo M, Mellerio JE, Kemp P, Mcgrath JA. Fibroblast cell therapy enhances initial healing in recessive dystrophic epidermolysis bullosa wounds: results of a randomized, vehicle-controlled trial Funding sources. *Br J Dermatol.* 2013.
  28. Tanaka T, Furukawa F, Imamura S. Epitope Mapping for Epidermolysis Bullosa Acquisita Autoantibody by Molecularly Cloned cDNA for Type VII Collagen. *J Invest Dermatol.* 1994 May;102(5):706–9.
  29. A Phase 1/2 Trial of PTR-01 in Adult Patients With Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03752905?term=PTR-01&rank=1>
  30. Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol Clin.* 2010 Jan;28(1):93–105.
  31. Chen M, Costa FK, Lindvay CR, Han Y-P, Woodley DT. The recombinant expression of full-length type VII collagen and characterization of molecular mechanisms underlying dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology;* 2002 Jan 18;277(3):2118–24.
  32. Alberts B. *Biologia molecular da celula* [Internet]. Artes Medicas; 2010.
  33. Gorres KL, Raines RT. Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol. NIH Public Access;* 2010 Apr;45(2):106–24.
  34. Wang T, Lew J, Premkumar J, Poh CL, Win Naing M. Production of recombinant collagen: state of the art and challenges. *Eng Biol.* 2017 Jun 1;1(1):18–23.
  35. Michels A, Frei B. Myths, Artifacts, and Fatal Flaws: Identifying Limitations and Opportunities in Vitamin C Research. *Nutrients. Multidisciplinary Digital Publishing Institute;* 2013 Dec 16;5(12):5161–92.
  36. Bruckner-Tuderman L, Höpfner B, Hammami-Hauasli N. Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix Biol. Elsevier;* 1999 Feb 1;18(1):43–54.
  37. Fields GB. Interstitial Collagen Catabolism. *J Biol Chem.* 2013 Mar 29;288(13):8785–93.
  38. Kühl T, Mezger M, Hausser I, Guey LT, Handgretinger R, Bruckner-Tuderman L, et al. Collagen VII Half-Life at the Dermal-Epidermal Junction Zone: Implications for Mechanisms and Therapy of Genodermatoses. *J Invest Dermatol.* 2016 Jun;136(6):1116–23.
  39. Altamirano C, Berrios J, Vergara M, Becerra S. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electron J Biotechnol.* 2013 May 15;16(3).
  40. Seltzer JL, Eisen AZ, Bauer EA, Morris NP, Glanville RW, Burgeson RE. Cleavage of type VII collagen by interstitial collagenase and type IV collagenase (gelatinase) derived from human skin. *J Biol Chem.* 1989 Mar 5;264(7):3822–6.

41. Sawamura D, Sugawara T, Hashimoto I, Bruckner-Tuderman L, Fujimoto D, Okada Y, et al. Increased gene expression of matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) in skin fibroblasts from patients with severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Jan 31;174(2):1003–8.
42. Pulkoski-Gross AE. Historical perspective of matrix metalloproteases. In: *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2015. p. 125–49.
43. Amano S, Ogura Y, Akutsu N, Matsunaga Y, Kadoya K, Adachi E, et al. Protective effect of matrix metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process. *Br J Dermatol*. 2005;153(s2):37–46.
44. Iriyama S, Tsunenaga M, Amano S, Adachi E. Key role of heparan sulfate chains in assembly of anchoring complex at the dermal-epidermal junction. *Exp Dermatol* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2011 Nov 1;20(11):953–5.
45. Minond D, Lauer-Fields JL, Cudic M, Overall CM, Pei D, Brew K, et al. The Roles of Substrate Thermal Stability and P2 and P1' Subsite Identity on Matrix Metalloproteinase Triple-helical Peptidase Activity and Collagen Specificity. *J Biol Chem*. 2006 Dec 15 [cited 2017 Nov 1];281(50):38302–13.
46. Williams KE, Olsen DR. Matrix metalloproteinase-1 cleavage site recognition and binding in full-length human type III collagen. *Matrix Biol*. 2009 Jul;28(6):373–9.
47. Wu H, Byrne MH, Stacey A, Goldring MB, Birkhead JR, Jaenisch R, et al. Generation of collagenase-resistant collagen by site-directed mutagenesis of murine pro alpha 1(I) collagen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Aug;87(15):5888–92.
48. Liu X, Wu H, Byrne M, Jeffrey J, Krane S, Jaenisch R. A targeted mutation at the known collagenase cleavage site in mouse type I collagen impairs tissue remodeling. *J Cell Biol*. 1995 Jul;130(1):227–37.
49. Overall CM. Molecular Determinants of Metalloproteinase Substrate Specificity: Matrix Metalloproteinase Substrate Binding Domains, Modules, and Exosites. *Mol Biotechnol*. Humana Press; 2002 ;22(1):051–86.
50. ClinVar [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
51. Jun-ichi M, Satoshi T, Kimi A, Fumi T, Akira T, Kiyoshi T, et al. Expression vector system based on the chicken  $\beta$ -actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene*. Elsevier; 1989 Jul 15;79(2):269–77.
52. Urlaub G, Mitchell PJ, Kas E, Chasin LA, Funanage VL, Myoda TT, et al. Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions. *Somat Cell Mol Genet*. 1986 Nov;12(6):555–66.
53. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*. American Society for Microbiology (ASM); 1987 Jan;7(1):379–87.
54. Freshney RI. *Culture of Animal Cells*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010.

55. Kaufman RJ, Wasley LC, Spiliotes AJ, Gossels SD, Latt SA, Larsen GR, et al. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol.* American Society for Microbiology (ASM); 1985 Jul;5(7):1750–9.
56. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402–8.
57. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol.* 2018 Dec 6;36(12):1136–45.
58. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2004 Nov;22(11):1393–8.
59. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol.* 2014;32:992–1000.
60. Kingston RE, Kaufman RJ, Bebbington CR, Rolfe MR. Amplification Using CHO Cell Expression Vectors. In: *Current Protocols in Molecular Biology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2002. p. Unit 16.23.
61. Mishra PJ, Menon LG, Mishra PJ, Mayer-Kuckuk P, Bertino JR, Banerjee D. Translational modulation of proteins expressed from bicistronic vectors. *Mol Imaging.* 2009 Dec;8(6):305–18.
62. Chen N, Wang W-M, Wang H-L. An efficient full-length cDNA amplification strategy based on bioinformatics technology and multiplexed PCR methods. *Sci Rep.* 2016 Dec 13;6(1):19420.
63. Yamamoto T, Shikano K, Nanki T, Kawai S. Folylpolylglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. 2016.
64. Siprashvili Z, Nguyen NT, Bezchinsky MY, Marinkovich MP, Lane AT, Khavari PA. Long-term type VII collagen restoration to human epidermolysis bullosa skin tissue. *Hum Gene Ther.* Mary Ann Liebert, Inc.; 2010 Oct;21(10):1299–310.
65. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2012 Dec;1826(2):443–57.
66. Wilson JX. REGULATION OF VITAMIN C TRANSPORT. *Annu Rev Nutr.* 2005 Aug 21;25(1):105–25.
67. Peterkofsky B. The Effect of Ascorbic Acid on Collagen Polypeptide Synthesis and Proline Hydroxylation During the Growth of Cultured Fibroblasts.
68. Invitrogen Corp Life Technologies Corp. Serum-free mammalian cell culture medium, and uses thereof. US8198084B2. 2015.10.28.
69. Inventors: Marinkovich; M. Peter (Redwood City, CA), Lane; Alfred T. (Los Altos, CA), Rajadas; Jayakumar (Cupertino C, Applicant: The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University, THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS, Stanford, Washington, CA, et al. Production and delivery of a stable collagen. 2015.

70. Georgiadis C, Syed F, Petrova A, Abdul-Wahab A, Lwin SM, Farzaneh F, et al. Lentiviral Engineered Fibroblasts Expressing Codon-Optimized COL7A1 Restore Anchoring Fibrils in RDEB. *J Invest Dermatol*. Elsevier; 2016 Jan 1;136(1):284–92.
71. Clincke M-F, Guedon E, Yen FT, Ogier V, Goergen J-L. Characterization of metalloprotease and serine protease activities in batch CHO cell cultures: control of human recombinant IFN- $\gamma$  proteolysis by addition of iron citrate. *BMC Proc* [Internet]. 2011;5(Suppl 8):P115.