

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Produção e nanoencapsulação da fotoliase para aplicações tópicas

Karin Mariana Torres Obreque

Tese para obtenção do título de Doutora

Orientadoras: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui (USP)
Profa. Dra. Patrizia Perego (UNIGE)

São Paulo
2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Produção e nanoencapsulação da fotoliase para aplicações tópicas

Karin Mariana Torres Obreque

Versão Original

Tese para obtenção do título de Doutora

Orientadoras: Prof. Dr. Carlota de Oliveira Rangel Yagui (USP)

Prof. Dr. Patrizia Perego (UNIGE)

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T693p Torres-Obreque, Karin Mariana
Produção e nanoencapsulação da fotoliase para aplicações tópicas / Karin Mariana Torres-Obreque. - São Paulo, 2024.
125 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira
Coorientador: Perego, Patrizia

1. photolyase. 2. fed-batch bioreactor. 3. polymersome. 4. liposome. 5. polymeric nanoparticle. I. T. II. Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira, orientador. III. Perego, Patrizia, coorientador.

Karin Mariana Torres Obreque

**Produção e nanoencapsulação da fotoliase para
aplicações tópicas**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Prof. Dr. Carlota de Oliveira Rangel Yagui
Orientadora

Prof. Dr. Patrizia Perego
Co-orientadora

1° examinador

2° examinador

3° examinador

São Paulo, _____, 2024.

**“Equipped with his five senses, human explores
the universe around him and calls
the adventure SCIENCE”**

- Edwin Powell Hubble -

Dedico esta tesis a mi familia
que siempre ha creído en mi más que yo misma

Special thanks

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

By Becas Chile, for my scholarship ANID/Doctorado en el Extranjero (2020–72210489) during my stay in Brazil and Italy.

And by FAPESP, for the funds attributed to processes 2020/08129 6 and 2022/01138-5.

My greatest gratitude to my advisor Dr. Carlota, which I admire, who fully trusted in my ability, who pushed me when it was necessary and, above all, who was humane to understand me. Thank you for guiding me in every step, for teaching me and leading my research to the great results that we obtained.

My thanks to my co-advisor Dr. Patrizia, who opened the doors of her laboratory to me and gave me the opportunity to study and live in Genova. To her and the entire team, Attilio, Roberta, Pier Francesco, Chiara, Maria, Emanuela, Li and Shabnam, thank you very much for your teachings, your support and your friendship.

I would like to especially thank to my brother Adriel, my mother Lisbet and my father Cristian for all the support provided throughout my career, for their visits to Brazil and Italy, for their wise advice, for their faith in my abilities, for growing and maturing with me, and for taking care of me when I need it most.

Thanks to my grandfather Alejandrino (*in memoriam*) and my grandmother Ana, for being interested even when it was difficult to understand, for being with me and encouraging me to continue.

Thank to Jhennifer, Katty, Rafael, Gustavo, Javier, Grace, Natalia, Amanda, Massiel, Alison, for the friendship beyond science.

Thank to Felipe and Carla for your dedication to our Photolyase Team.

Thank to Perla, Alexis and Darío for be my family.

Thanks to all the members of the Quinchamali group, for the company, the opportunities and the good times. Thank you for giving me Chile in Sao Paulo.

Thank to Alejandra, for being a wonderful friend and taking me out of the lab to remember that there are more.

Thank to Flaviana, for always be with me, in the late nights in the lab, the parties, the boring weekend afternoons. Thank you for helping me enjoy life.

Thank to Shabnam, for the beginning of a lifelong friendship, for coming from two different place of the world and finding us.

I want to thank each of the people who were present on this difficult path, full of academic, professional and emotional challenges. I had to spend a large part of my PhD in quarantine due to the COVID-19 pandemic, including all the challenges that the “return to normal” brought later. I challenged myself to live an ocean away and learning a new language (Italian is my fourth language). I had to develop my doctorate during a difficult time for me in personal and family aspect, leading me to present health problems. In short, it was a truly challenging stage of my life, and thanks to the love and patience of each of the people in my life I was able to reach the end of the road. I am proud of my thesis, and I am proud to have achieved it.

¡Muchas gracias!

Muito Obrigada!

Grazie Mille!

Thank you so much!

RESUMO

TORRES-OBREQUE, K.M. **Produção e nanoencapsulação da fotoliase para aplicações tópicas**, 2024. 126f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A radiação ultravioleta (UV) da luz solar pode induzir danos ao DNA, levando à formação de fotoprodutos que podem, eventualmente, resultar em câncer de pele. A aplicação tópica de enzimas reparadoras de DNA, como a fotoliase, representa uma estratégia inovadora para fotoproteção ativa. Nesse sentido, a nanoencapsulação da fotoliase oferece alternativa promissora para facilitar o acesso da enzima às camadas mais profundas da pele. Este projeto teve como objetivo produzir uma fotoliase recombinante, caracterizá-la e nanoencapsular a enzima em polimerossomas (PL), lipossomas (LP) e nanopartículas poliméricas (PNP). A fotoliase foi produzida por *E. coli* recombinante em processos conduzidos em agitador metabólico e biorreatores descontínuos e alimentados. Após extração e purificação por cromatografia de afinidade, a fotoliase exibiu massa molecular de 47 kDa com um rendimento de 480 mg de proteína pura por litro de cultura em batelada alimentada. Concentrações muito baixas de fotoliase, como 15 µg/mL, apresentaram 90% de reparo de CPD em amostras de DNA *in vitro*. Posteriormente, nanoestruturas foram desenvolvidas usando estratégias de planejamento de experimentos (DoE) para otimizar o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e a eficiência de encapsulamento (EE). Valores nanométricos de Dh foram obtidos para todas as nanoestruturas. EE de 23% foram alcançados para PL e LP, e >90% para PNP. Os PL exibiram a melhor liberação da enzima ao longo do tempo (até 35% após 24h), sendo que as PNP apresentaram a menor taxa de liberação atingindo somente ≈ 15% após 10 dias. Baseados em estudos de citotoxicidade *in vitro*, os PL, LP e PNP foram classificados como materiais não irritantes. Finalmente, tanto a fotoliase livre quanto a encapsulada em PL e LP foi capaz de proteger as células da radiação UV, resultando em viabilidades celulares de 37% para a enzima livre e 50-60% na forma nanoencapsulada, comparado a 28% de viabilidade sem o tratamento com a enzima. No geral, nosso estudo demonstra a produção eficiente da fotoliase de *T. thermophilus* e sua capacidade em reparar danos de CPD, principalmente quando encapsulada em PL, oferecendo uma alternativa promissora e inovadora como ingrediente ativo para incorporação em produtos dermatológicos.

Palavras-chave: fotoliase, biorreator de batelada alimentada, polimerossoma, lipossoma, nanopartículas poliméricas.

ABSTRACT

TORRES-OBREQUE, K.M. **Photolyase production and nanoencapsulation for topical applications**, 2024. 126p. Thesis (PhD) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Ultraviolet (UV) radiation from sunlight can induce DNA damage, leading to the formation of photoproducts that can eventually result in skin cancer. Topical application of DNA repair enzymes, such as photolyase, represents an innovative strategy for active photoprotection. In this sense, photolyase nanoencapsulation offers a promising route to facilitate the access of enzymes to the deeper layers of the skin. This work aimed to produce the recombinant photolyase, characterize it, and investigate nanostructures for the enzyme encapsulation, namely polymersomes (PL), liposomes (LP) and polymeric nanoparticles (PNP). Photolyase production by recombinant *E. coli* was investigated in metabolic shaker and batch and fed-batch bioreactors. After extraction and purification by affinity chromatography, the photolyase exhibited a molecular weight of 47 kDa with a yield of 480 mg of pure protein per liter of fed-batch culture. Very low photolyase concentrations, such as 15 µg/mL, already presented 90% of CPD repair in DNA samples *in vitro*. Subsequently, nanostructures were developed based on design of experiments (DoE) to optimize the hydrodynamic diameter (Dh) and encapsulation efficiency (EE). Nanometric values of Dh were obtained for all nanostructures. EE of 23% was achieved for both PL and LP, and >90% for PNP. PL exhibited the best enzyme release profile to the external medium over time (up to 35% after 24h), while PNP presented the lowest release reaching only ≈ 15% after 10 days. Based on *in vitro* cytotoxicity studies, PL, LP and PNP were classified as non-irritating material. Finally, both free and photolyase-loaded PL and LP were able to protect cells from UV radiation, resulting in cell viability recoveries of 37% for the free enzyme and 50-60% when nanoencapsulated, compared to 28% without the enzyme. Overall, our study demonstrates efficient production of *T. thermophilus* photolyase and the enzyme ability to repair CPD damage, particularly when encapsulated in PL, offering a promising and innovative alternative as an active ingredient for incorporation into dermatological products.

Keywords: photolyase, fed-batch bioreactor, polymersome, liposome, polymeric nanoparticle.

RIASSUNTO

TORRES-OBREQUE, KM. **Produzione e nanoincapsulamento di fotoliasi per applicazioni topiche**, 2024. 126f. Tesi (PhD) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, San Paolo, 2024.

Le radiazioni ultraviolette (UV) provenienti dalla luce solare possono indurre danni al DNA, portando alla formazione di fotoprodotti che possono eventualmente provocare il cancro della pelle. L'applicazione topica degli enzimi riparatori del DNA, come la fotoliasi, rappresenta una strategia innovativa per la fotoprotezione attiva. In questo senso, la nanoincapsulazione della fotoliasi offre un'alternativa promettente per facilitare l'accesso dell'enzima agli strati più profondi della pelle. Questo progetto ha oggettivato produrre una fotoliasi ricombinante, caratterizzarla e nanoincapsulare l'enzima in polimerisomi (PL), liposomi (LP) e nanoparticelle polimeriche (PNP). La fotoliasi è stata prodotta da *E. coli* ricombinante in processi condotti in agitatori metabolici e bioreattori batch e fed-batch. Dopo l'estrazione e la purificazione mediante cromatografia di affinità, la fotoliasi presentava una massa molecolare di 47 kDa con una resa di 480 mg di proteina pura per litro di coltura fed-batch. Concentrazioni molto basse di fotoliasi, come 15 µg/mL, hanno mostrato una riparazione CPD del 90% nei campioni di DNA *in vitro*. Successivamente, sono state sviluppate nanostrutture utilizzando strategie di progettazione degli esperimenti (DoE) per ottimizzare il diametro idrodinamico (Dh) e l'efficienza di incapsulamento (EE). Per tutte le nanostrutture sono stati ottenuti valori nanometrici di Dh. Un EE del 23% è stato raggiunto per PL e LP e >90% per PNP. PL ha mostrato il miglior rilascio dell'enzima nel tempo (fino al 35% dopo 24 ore), mentre PNP ha mostrato il tasso di rilascio più basso, raggiungendo solo ≈ 15% dopo 10 giorni. Sulla base degli studi di citotossicità *in vitro*, PL, LP e PNP sono stati classificati come materiali non irritanti. Infine, sia la fotoliasi libera che quella incapsulata con PL e LP sono state in grado di proteggere le cellule dalle radiazioni UV, determinando una vitalità cellulare del 37% per l'enzima libero e del 50-60% nella forma nanoincapsulata, rispetto al 28% di vitalità senza trattamento enzimatico. Nel complesso, il nostro studio dimostra l'efficiente produzione della fotoliasi di *T. thermophilus* e la sua capacità di riparare il danno CPD, soprattutto se incapsulato in PL, offrendo un'alternativa promettente e innovativa come ingrediente attivo da incorporare nei prodotti dermatologici.

Parole chiave: fotoliasi, bioreattore fed-batch, polimerisoma, liposoma, nanoparticella polimerica