



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ANTÔNIO MÁRCIO SANTANA FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE UM HIPOALÉRGENO MULTICOMPONENTE DE
EPÍTOPOS DE CÉLULAS T DOS ALERGENOS Der p 1, Der p 2 e Der p 23 E SEU
USO POTENCIAL NO TRATAMENTO DA ALERGIA AO ÁCARO
*Dermatophagoides pteronyssinus***

Salvador- Bahia
2022

ANTÔNIO MÁRCIO SANTANA FERNANDES

DESENVOLVIMENTO DE UM HIPOALÉRGENO MULTICOMPONENTE DE
EPÍTOPOS DE CÉLULAS T DOS ALERGENOS Der p 1, Der p 2 e Der p 23 E SEU
USO POTENCIAL NO TRATAMENTO DA ALERGIA AO ÁCARO
Dermatophagoides pteronyssinus

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Dentro da linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Agentes Profiláticos, Terapêuticos e Biofármacos, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carina da Silva Pinheiro.

Coorientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves.

Salvador- Bahia
2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Fernandes, Antônio Márcio Santana
DESENVOLVIMENTO DE UM HIPOALÉRGENO MULTICOMPONENTE
DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T DOS ALERGENOS Der p 1, Der p
2 e Der p 23 E SEU USO POTENCIAL NO TRATAMENTO DA
ALERGIA AO ÁCARO Dermatophagoides pteronyssinus /
Antônio Márcio Santana Fernandes. -- Salvador, 2022.
180 f. : il

Orientadora: Carina da Silva Pinheiro.
Coorientadora: Neuza Maria Alcântara Neves.
Tese (Doutorado - Biotecnologia) -- Universidade
Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde,
2022.

1. Ácaros da poeira doméstica. 2. hipoalérgenos.
3. imunogenicidade. 4. candidato vacinal. 5.
imunoterapia alérgeno-específica . I. da Silva
Pinheiro, Carina. II. Alcântara Neves, Neuza Maria.
III. Título.


ANTÔNIO MÁRCIO SANTANA FERNANDES


“Desenvolvimento de um hipoaérgeno multicomponente de epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 e seu uso potencial no tratamento da alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*”

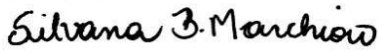
Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.


Aprovada em 07 de julho de 2022.

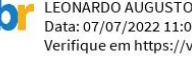
BANCA EXAMINADORA:

Carina da Silva Pinheiro– Orientadora 
Doutora em Biomedicina pelo Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte IEP-SCBH, Brasil.
Universidade Federal da Bahia

Ricardo Wagner Dias Portela 
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Silvana Beutinger Marchioro 
Doutora em Faculty of Veterinary Sciences pelo Ghent University, UGENT, Bélgica.
Universidade Federal da Bahia

Luciana Santos Cardoso 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia UFBA, PPGIM, Brasil.
Universidade Federal da Bahia

Leonardo Augusto de Almeida 
Doutor em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
Universidade Federal de Alfenas.



Documento assinado digitalmente
LEONARDO AUGUSTO DE ALMEIDA
Data: 07/07/2022 11:07:43-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

À minha mãe, **Maria**, e ao meu pai,
Manoel, que mesmo não sabendo a
importância disso tudo, me apoia
incondicionalmente, e a quem sou
grato por todo amor.

Òké Aro!!! Arolé! Òsóòsi

“O mar azul e branco e as luzidias
Pedras: O arfado espaço
Onde o que está lavado se relava
Para o rito do espanto e do começo
Onde sou a mim mesma devolvida
Em sal espuma e concha regressada
À praia inicial da minha vida”

Sophia de Mello Breyner Andresen

AGRADECIMENTOS

Ao universo, que de alguma forma conspira para que as coisas aconteçam.

À Profa. Dra. Carina da Silva Pinheiro, pela orientação, ensinamentos e oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Obrigado pela idealização e por todo o suporte na condução desse e de outros trabalhos.

A Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves, pela coorientação, pelas ideias e oportunidade de desenvolver esse estudo.

A Gubio Soares e a Profa. Silvia, a quem recorri em diversos momentos

A Profa. Dra. Daise, pela disponibilidade e boa vontade na execução das análises histopatológicas, parte fundamental nesse trabalho, obrigada pelo suporte.

A Eduardo essencial em diversos momentos, obrigado pela paciência e ensinamento.

A Raphael e Elis, amigos mais próximos dentro da pós-graduação que passamos a contar um outro em diversos momentos.

A toda equipe do Laboratório de Alergia e Acarologia, aos colegas Leonardo, Eduardo, Emilia, Vitor, Daise, Elis e Raphael parte fundamental na execução da eutanásia, sem eles não seria possível. Muito obrigado.

A Carlos Neves pelo apoio, estímulo e exemplo, muito obrigado.

Aos amigos de longas datas a quem devo muito e que sempre estão prontos a ajudar e incentivar: Jonas Vasconcellos, Eliene Freitas, Silvania Silva, Nubia Pinto, Marcos Romão.

A Universidade Federal da Bahia (UFBA), ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), que deram subsídios à minha formação acadêmica.

E por fim, a todos que não cabem aqui citar e que de uma forma ou outra me ajudaram na construção deste sonho. Muito obrigado!

LISTAS DE ABREVIATURAS

AIT	<i>Allergen-specific immunotherapy</i> (inglês); Imunoterapia alérgeno-específica (português)
BALF	<i>Bronchoalveolar lavage fluid</i>
Breg	Células B reguladoras
CCL2	Quimiocinas 2
CCL20	Quimiocinas 20
DC2	Células dendríticas tipo2
DpE	<i>D. pteronyssinus extract</i> (inglês); extrato de <i>D. pteronyssinus</i> (português)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (inglês); ensaio de imunoabsorção enzimática (português)
EPO	<i>Eosinophilic Peroxidase</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte and macrophage colony stimulating factor</i>
His	<i>Histidine</i>
HRP	<i>Streptavidin-horseradish peroxidase</i>
IFN- α 2	<i>Human interferon alpha-2</i>
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina 1
IgG	Imunoglobulina 2A
IL-1 α	<i>Interleukin-1α</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1β</i>
IL-1ra	<i>Interleukin-1ra</i>
IL-2	<i>Interleukin 2</i>
IL-4	<i>Interleukin 4</i> (inglês); Interleucina 4 (português)
IL-5	<i>Interleukin 5</i> (inglês); Interleucina 5 (português)
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-10	<i>Interleukin 10</i> (inglês); Interleucina 10 (português)
IL-12 (p40)	<i>Interleukin 12 (p40)</i>
IL-13	<i>Interleukin 13</i> (inglês); Interleucina 13 (português)
IL-15	<i>Interleukin 15</i>
IL-17A	<i>Interleukin 17A</i>
IL-21	<i>Interleukin 21</i> (inglês); Interleucina 21 (português)
ILC2s	<i>Group 2 innate lymphoid cells</i> (inglês); Células linfóides inatas do tipo 2 (português)
IPTG	<i>Sopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> (inglês); Isopropil- β -D-tiogalactopirosídeo (português)
ISAAC	<i>The international study of asthma and allergies in childhood</i>
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
KDa	Kilodalton

KSCN	<i>Potassium thiocyanate</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage-1α inflammatory protein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (inglês); complexo principal de histocompatibilidade (português)
NaP	<i>Sodium phosphate</i>
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	<i>o-Phenylenediamine</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (inglês); salina tamponada com fosfato (português)
pH	Potencial hidrogeniônico
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i>
ProAR	<i>Bahia State Program for the Control of Asthma and Allergic Rhinitis</i> (inglês); Programa de controle de asma e da rinite alérgica na Bahia (português)
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i>
SCAALA	<i>Social Change in Asthma and Allergy in Latin America</i>
SCIT	<i>subcutaneous immunotherapy</i> (inglês); imunoterapia subcutânea (português)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIgE	<i>Specific IgE</i>
SIgG1	<i>Specific IgG1</i>
SIgG2a	<i>Specific IgG2a</i>
SIT	<i>Allergen-specific immunotherapy</i>
SPT	<i>Skin prick test</i>
Tfh	Células T foliculares auxiliares
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TH1	<i>T helper 1</i> (inglês); T auxiliar 1 (português)
TH17	<i>T helper 17</i>
TH2	<i>T helper 2</i> (inglês); T auxiliar 2 (português)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
Tregs	Células T reguladoras
uGDT(GDT)	<i>Measures the absolute model quality</i>

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação Teórica:

- Figura 01-** Representação esquemática do mecanismo de inflamação alérgica.....24
- Figura 02-** Mecanismos da imunoterapia alérgeno específica.....31

Manuscrito 01:

- Figure 01-** Structural and *in vitro* characterization of rDer p 223165
- Figure 02-** Cytokine concentrations in cultures of peripheral blood mononuclear cells from healthy and allergic individuals stimulated with rDer p 2231 and *D. pteronyssinus* extract (DpE) and pokeweed mitogen (PWM).....66
- Figure 3-** *In vivo* responses of the hypoallergenic hybrid rDer p 2231 in serum.....67
- Figure 4-** Effect of hypoallergenic hybrid rDer p 2231 on cellular inflammation and eosinophil peroxidase activity..... 68
- Figure 5-** Influence of hypoallergenic hybrid rDer p 2231 on cytokines levels from splenocytes, BALF and lung tissue of mice..... 69
- Figure S1-** Expression and purification of rDer p 1, and human sIgE reaction to wild type allergens blocker assay.....83
- Figure S2-** *In vivo* responses of the hypoallergenic hybrid rDer p 2231 in BALF and lung.....84

Manuscrito 02:

- Figure 01-** *In vivo* responses of hypoallergenic hybrid rDer p 2231111
- Figure 02-** Effect of hypoallergenic protein on cellular inflammation and eosinophil peroxidase activity112
- Figure 3-** Influence of rDer p 2231 on cytokines levels in BALF, lung tissue and cells from the spleen of mice.....113
- Figure 4-** Representative photomicrographs of histological analysis of mouse lung airway from all experimental groups. H/E staining.....114
- Figure 5-** Representative photomicrographs of extracellular matrix remodeling in mouse lung airway from all experimental groups.....115

Figure A1- Kinetics of serum levels of specific antibodies to <i>D. pteronyssinus</i> in sera from mice submitted to a chronic asthma model and treated with rDer p 2231.....	117
--	-----

Patente:

Figura 1. Estruturas terciárias tridimensionais das diferentes modificações realizadas em relação a posição dos peptídeos de epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e p 23.....	158
--	-----

Figura 2. Expressão e purificação do híbrido hipoalergênico rDer p 2231 na linhagem BL21(DE3) pLysS, analisada em SDS-PAGE 12%.....	159
--	-----

Figura 3. Avaliação dos níveis de reatividade de IgE determinada por ELISA indireto em soros de pacientes alérgicos a <i>D. pteronyssinus</i>	159
--	-----

Figura 4. Níveis específicos de IgE, IgG1 e IgG2a contra DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e do híbrido hipoalergênico rDer p 2231 produzidos por camundongos tratados e não tratados com rDer p 2231.....	160
--	-----

Figura 5. Níveis específicos de IgE, IgG1 e IgG2a contra DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e rDer p 2231 produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231.....	161
---	-----

Figura 6. Níveis específicos séricos de IgE, IgG1 e IgG2a contra DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e rDer p 2231 produzidos por camundongos tratados e não tratados com híbrido hipoalergênico rDer p 2231.....	162
---	-----

Figura 7. Efeito da proteína híbrida hipoalergênica rDer p 2231 sobre a inflamação celular alérgica. (A) Contagem de células total (B) Contagem de células diferencial.....	163
--	-----

Figura 8. Análise do efeito da proteína hipoalergênica rDer p 2231 na atividade da peroxidase de eosinófilos em células do BAL e do tecido pulmonar de camundongos.....	164
--	-----

Figura 9. Análise do efeito de resposta das células T e perfil de modulação da proteína hipoalergênica rDer p 2231 produzidos por camundongos, inferidos mediante a quantificação dos níveis de citocinas (pg / mL)	165
--	-----

Figura 10. Resultados do efeito de resposta das células T-helper tipo 2 (Th2) mostrando os índices de IL-4 produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231.....	166
--	-----

Figura 11. Resultados do efeito de resposta das células T-helper tipo 2 (Th2) mostrando os índices de IL-5 produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231.....	166
--	-----

Figura 12. Resultados do efeito do perfil de modulação de resposta de esplenócitos, mostrando os índices de IL-10 produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231.....167

Figura 13. Resultados do efeito de resposta das células T-helper tipo 1 (Th1) mostrando os índices de INF γ produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231167

LISTA DE TABELAS

Fundamentação Teórica

Tabela 1 – Lista oficial dos alérgenos de *D. pteronyssinus* de acordo com a composição bioquímica e massa molecular em quilo Dalton (kDa), aprovada pelo Subcomitê de Nomenclatura Alergênica da Organização Mundial da Saúde e da *International Union of Immunological Societies* (OMS / IUIS).....277

Manuscrito 01:

Table 1. Distribution of *In vivo* model groups..... 61

Table S1. Responsive characteristics of the subjects included in the study..... 79

Table S2. Responsive characteristics of the PBMC donors.....80

Table S3. Sera and secondary antibodies dilutions..... 81

Table S4. Dilutions of samples and secondary antibodies used in ELISA assays..... 82

Manuscrito 02:

Table 1. *In vivo* model groups.....118

Table A1. Sera and secondary antibodies dilutions.....119

Table A2. Responsive characteristics of the subjects included in the study.....120

RESUMO

Introdução: A exposição a ácaros da poeira doméstica, como o *Dermatophagoides pteronyssinus*, desencadeia reações que estimulam e induzem a fisiopatologia da asma alérgica. A imunoterapia alérgeno-específica (AIT) é o único tratamento capaz de induzir tolerância a alérgenos e a única alternativa ao tratamento farmacológico atual, o qual apresenta diversos efeitos colaterais. Apesar de alguns protocolos da AIT serem realizados usando extratos brutos, trazendo algumas limitações, novas abordagens visam a construção de hipoalérgenos híbridos de epítomos de células T. Essas construções podem ser produzidas de forma a aumentar a imunogenicidade, reduzindo o número de moléculas que precisam ser produzidas para serem incluídas em uma formulação vacinal. **Objetivo:** Produzir uma proteína híbrida hipoalergênica baseada em epítomos de células T dos principais alérgenos do ácaro *D. pteronyssinus* para uso em imunoterapia em doenças alérgicas causadas por este ácaro. **Métodos:** O hipoalérgeno híbrido rDer p 2231, engenheirado utilizando epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 e purificado por cromatografia de afinidade, teve sua reatividade à IgE humana verificada em comparação aos alérgenos parentais. Um total de 18 citocinas foram avaliadas no sobrenadante de PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells*) de indivíduos atópicos e não atópicos, estimulados com rDer p 2231. O potencial terapêutico do híbrido rDer p 2231 também foi avaliado através de modelos murinos agudos e crônicos de alergia ao ácaro *D. pteronyssinus*. **Resultados:** PBMCs isolados de pacientes atópicos e esplenócitos de camundongos, quando estimulados com rDer p 2231, produziram níveis mais elevados de citocinas de perfil Th1 e citocinas reguladoras, enquanto reduziram citocinas Th2. O uso de rDer p 2231 como vacina terapêutica levou à redução da produção de IgE e menor atividade da peroxidase eosinofílica nas vias aéreas de camundongos alérgicos a *D. pteronyssinus*. O hipoalérgeno também atuou terapêuticamente no modelo crônico de alergia, reduzindo significativamente a hipertrofia da musculatura lisa, diminuição da fibrose da membrana sub-basal, hiperplasia de células caliciformes e resposta inflamatória alérgica. **Conclusão:** rDer p 2231 é uma molécula híbrida multicomponente com potencial para ser utilizada em AIT em pacientes co-sensibilizados aos principais alérgenos de *D. pteronyssinus*, uma vez que foi capaz de reduzir a produção de IgE, induzindo anticorpos bloqueadores alérgeno-específicos, restaurando e equilibrando as respostas Th1/Th2 e levando à indução de células T reguladoras, além de reduzir os efeitos patológicos teciduais associados à asma crônica.

Palavras-chave: Ácaros da poeira doméstica, hipoalérgenos, imunogenicidade, proteína quimérica, candidato vacinal, imunoterapia alérgeno-específica

ABSTRACT

Introduction: Exposure to house dust mites, such as *Dermatophagoides pteronyssinus*, triggers reactions that stimulate and induce the pathophysiology of allergic diseases, such as asthma. Allergen-specific immunotherapy (AIT) is the only treatment capable of inducing tolerance to allergens and the only alternative to current pharmacological treatment, which has adverse effects. Although some AIT protocols are performed using crude extracts, bringing some limitations, new approaches such as the hybrid hypoallergens of T cell epitopes brought innovation in the area. These constructs increase immunogenicity and improve production scale, since only one vaccine formulation will be need.

Objective: To produce a hypoallergenic hybrid protein based on T-cells epitopes of the main allergens of the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* for use in immunotherapy in allergic diseases caused by this mite. **Methods:** The rDer p 2231 hybrid hypoallergen, engineered using T cell epitopes from Der p 1, Der p 2 and Der p 23 allergens and purified by affinity chromatography, had its reactivity to human IgE verified in comparison to parental allergens. A total of 18 cytokines were evaluated in the supernatant of PBMCs from atopic and non-atopic individuals, stimulated with rDer p 2231. The therapeutic potential of the hybrid rDer p 2231 was also evaluated through acute and chronic murine models of *D. pteronyssinus* mite allergy. **Results:** PBMCs isolated from atopic patients and splenocytes from mice, when stimulated with rDer p 2231, produced higher levels of Th1 profile cytokines and regulatory cytokines, while reducing Th2 cytokines. The use of rDer p 2231 as a therapeutic vaccine led to reduced IgE production and lower eosinophilic peroxidase activity in the airways of mice allergic to *D. pteronyssinus*. The hypoallergen also acted therapeutically in the chronic model of allergy, significantly reducing smooth muscle hypertrophy, decreased subbasal membrane fibrosis, goblet cell hyperplasia and allergic inflammatory response. **Conclusion:** rDer p 2231 is a multicomponent hybrid molecule with potential to be used in AIT in patients co-sensitized to major *D. pteronyssinus* allergens, since it was able to reduce IgE production, inducing allergen-specific blocking antibodies, restoring and balancing Th1/Th2 responses and leading to the induction of regulatory T cells, in addition to reducing the tissue pathological effects associated with chronic asthma.

Keywords: House dust mites, hypoallergens, immunogenicity, chimeric protein, vaccine candidate, allergen-specific immunotherapy

Sumário

INTRODUÇÃO	17
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
OBJETIVOS.....	36
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO I.....	46
Manuscrito 01 – submetido na revista Clinical and Experimental Allergy.....	46
Recombinant T-cell epitope conjugation: a new approach for <i>Dermatophagoides hypoallergen design</i>	49
CAPÍTULO II.....	85
Manuscrito 02 – A ser submetido na revista molecular-immunology	85
Immunotherapy with hypoallergenic chimeric protein induces protective effect in a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> murine model of chronic asthma.....	85
CAPÍTULO III.....	122
Patente BR 10 2021 008111 2– Submetida ao INPI	122
Processo de construção e produção de proteína quimérica recombinante hipoalergênica a partir de epítomos de células T dos alérgenos dos grupos 1, 2 e 23 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>, para uso profilático e tratamento de doenças alérgica.....	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	173
ANEXOS	175

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As doenças alérgicas têm apresentado um significativo aumento na prevalência e morbidade nas últimas décadas (JULIA; MACIA; DOMBROWICZ, 2015), destacando-se como um importante problema de saúde pública, sendo incluídas no grupo de doenças crônicas, não transmissíveis, podendo afetar 30% a 40% da população mundial, especialmente crianças. Essas doenças geram grandes impactos socioeconômicos associados a custos diretos e indiretos, sobre os doentes, suas famílias e os serviços de saúde pública (CAFFARELLI; MASTRORILLI; PROCACCIANTI; SANTORO, 2020; MORAIS-ALMEIDA; PITE; AGUIAR; ANSOTEGUI *et al.*, 2020).

A rinite e a asma alérgica são as enfermidades alérgicas com maior prevalência mundial e estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, projetaram que aproximadamente 400 milhões de pessoas no mundo seriam acometidas pela rinite alérgica. Já a asma, afeta 300 milhões de indivíduos globalmente, com tendência de crescimento para 400 milhões, até 2025 (PAWANKAR, 2014). No Brasil, o ISAAC (*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) constatou, na fase I do estudo, que o país está em oitavo lugar na prevalência de asma no mundo, existindo ainda a necessidade constante da pesquisa em nosso país para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (SOLE; MELO; CAMELO-NUNES; FREITAS *et al.*, 2007; TO; STANOJEVIC; MOORES; GERSHON *et al.*, 2012; 2021).

Entre os vários agentes desencadeantes ou agravantes das doenças alérgicas, os ácaros da poeira doméstica tem sido apontados como um dos principais fatores etiológicos causadores de alergia em todo o mundo (FONSECA, 2008). Aproximadamente 40 espécies de ácaros presentes na poeira doméstica manifestam capacidade alergizante. Destacam os ácaros *Blomia tropicalis* com maior prevalência em países tropicais e subtropicais, o *Dermatophagoides farinae* em regiões temperadas, e o *Dermatophagoides pteronyssinus*, com distribuição cosmopolita (HOLT; THOMAS, 2005; YONG; JEONG, 2009).

O ácaro *D. pteronyssinus* é considerado uma importante fonte de sensibilização alérgica, sendo fator de risco para o desenvolvimento de doenças respiratórias alérgicas em pacientes geneticamente predispostos

(SILVA; PINHEIRO; PACHECO; ALCANTARA-NEVES, 2020; YEPES-NUNEZ; GOMEZ-GARCIA; ESPINOSA-HERRERA; CARDONA-VILLA, 2012). No sul do Brasil este ácaro representa 72% e 84% do total de ácaros presentes em berços e camas, respectivamente (DA SILVA; BINOTTI; DA SILVA; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Embora 30 alérgenos diferentes de *D. pteronyssinus* já tenham sido descritos (WHO/IUIS, 2019), Der p 1, Der p 2, e mais recente o Der p 23, representam os alérgenos clinicamente mais importantes (POSA, D.; PERNA, S.; RESCH, Y.; LUPINEK, C. *et al.*, 2017; SILVA; PINHEIRO; PACHECO; ALCANTARA-NEVES, 2020). Por causa disso, uma vacina contra *D. pteronyssinus* precisa incluir esses três alérgenos (WEGHOFER; GROTE; RESCH; CASSET *et al.*, 2013).

Terapias atualmente disponíveis combinam anti-mediadores e anti-inflamatórios tais como anti-histamínicos, anti-leucotrienos, corticosteroides e novos produtos biológicos recentemente aprovados, como os anticorpos monoclonais (KANG; RHEE; LEE; YOON *et al.*, 2016; VIRCHOW, 2019). Estes medicamentos suprimem temporariamente os sintomas e o processo inflamatório em andamento, mas não afetam o curso da doença (AGACHE; LAU; AKDIS; SMOLINSKA *et al.*, 2019; PFAAR; LOU; ZHANG; KLIMEK *et al.*, 2018), sendo drogas paliativas. Os corticosteroides são considerados os mais eficientes, mas possui desvantagens, com efeitos colaterais a médio e longo prazo (CIRIACO; VENTRICE; RUSSO; SCICCHITANO *et al.*, 2013; HOSSNY; ROSARIO; LEE; SINGH *et al.*, 2016). Os gastos com drogas paliativas no tratamento de doenças alérgicas são grandes e crescentes, levando em conta a alta prevalência dessas doenças em escala mundial. No Brasil, dados do sistema público de saúde, apontam que a asma é responsável por gastos acima dos R\$ 106 milhões anuais por internações (DAMASCENO; COSTA-CARVALHO; SOLÉ; WANDALSEN, 2012; FRANCO; NASCIMENTO; CRUZ; SANTOS *et al.*, 2009).

Na contramão das drogas paliativas, a imunoterapia alérgeno-específica (AIT) é o único tratamento para doenças alérgicas, capaz de impedir o início de novas sensibilizações alérgicas e da progressão da doença (DHAMI; KAKOUROU; ASAMOAH; AGACHE *et al.*, 2017; PFAAR; LOU; ZHANG; KLIMEK *et al.*, 2018; VIRCHOW, 2019), resultando na melhora dos sintomas e diminuição da necessidade de farmacoterapia paliativa (GLOBINSKA;

BOONPIYATHAD; SATITSUKSANO; KLEUSKENS *et al.*, 2018; PFAAR; ALVARO; CARDONA; HAMELMANN *et al.*, 2018; VIRCHOW, 2019). AIT consiste na administração de doses crescentes de um alérgeno (ou extrato alergênico) a pacientes alérgicos com o objetivo de induzir uma resposta imunológica tolerogênica (BERINGS; KARAASLAN; ALTUNBULAKLI; GEVAERT *et al.*, 2017; KUCUKSEZER; OZDEMIR; CEVHERTAS; OGULUR *et al.*, 2020).

A utilização de extratos brutos diluídos na AIT apresenta desvantagens já descritas em diversas publicações (AKDIS; AKDIS, 2015; FERREIRA; WOLF; WALLNER, 2014; WALLNER; PICHLER; FERREIRA, 2013), como epítomos intactos de células B que são prontamente capazes de se ligar a moléculas de IgE específicas na superfície das células efectoras (VALENTA; CAMPANA; FOCKE-TEJKL; NIEDERBERGER, 2016). Para superar as desvantagens, uma série de ensaios utilizando derivados hipoalergênicos recombinantes (JONGEJAN; VAN REE; POULSEN, 2016; JUTEL; KOSOWSKA; SMOLINSKA, 2016; SILVA; PINHEIRO; QUINTELLA; FERREIRA *et al.*, 2016; WAI; LEUNG; LEUNG; CHU, 2017) e hipoalérgenos recombinantes de epítomos de células T (MACKENZIE, KAREN J; FITCH, PAUL M; LEECH, MELANIE D; ILCHMANN, ANNE *et al.*, 2013; PRICKETT, S.; ROLLAND, J.; O'HEHIR, R., 2015), tem sido propostos como uma abordagem inovadora para melhorar os protocolos da AIT, por serem menos passíveis de suscitar reações colaterais (HOYNE; O'HEHIR; WRAITH; THOMAS *et al.*, 1993; MACKENZIE, K. J.; FITCH, P. M.; LEECH, M. D.; ILCHMANN, A. *et al.*, 2013; MACKENZIE, KAREN J; FITCH, PAUL M; LEECH, MELANIE D; ILCHMANN, ANNE *et al.*, 2013; PRICKETT, S. R.; ROLLAND, J. M.; O'HEHIR, R. E., 2015).

Tendo em vista a necessidade de reduzir a alergenicidade das vacinas atualmente utilizadas na imunoterapia, mantendo a imunogenicidade, contudo aumentando a segurança e reduzindo os efeitos colaterais, faz-se necessário o estudo e caracterização de novos alérgenos, os quais podem ser obtidos através da utilização da tecnologia do DNA recombinante. Sendo assim, o projeto atual prevê a obtenção de uma proteína hipoalergênica baseada em epítomos de células T dos principais alérgenos do ácaro *D. pteronyssinus* (*der p 1*, *der p 2* e *der p 23*) e a avaliação dessa molécula como um candidato vacinal contra alergia induzida pelo ácaro *D. pteronyssinus*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

ALERGIAS RESPIRATÓRIAS

As manifestações alérgicas, referem-se à síntese de imunoglobulinas do isotipo IgE específica contra componentes proteicos de alérgenos, causando inflamação tecidual e disfunção orgânica (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; HOLGATE, 2012). As manifestações clínicas mais comuns das doenças alérgicas respiratórias são a rinite e a asma alérgica, as quais são doenças atópicas que na maioria das vezes são desencadeadas pela exposição à alérgenos presentes na poeira domiciliar (AGACHE; LAU; AKDIS; SMOLINSKA *et al.*, 2019; FONSECA, 2008).

A atopia, caracteriza-se pela propensão genética a responder exacerbadamente a baixas doses de alérgenos, com produção de anticorpos IgE específica e elevação nos níveis de eosinófilos, tornando o indivíduo atópico mais susceptível a doenças alérgicas. A produção de IgE é dependente do aumento das populações de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocinas do tipo Th2, que orquestram a cascata inflamatória alérgica, desempenhando uma função importante na sensibilização alérgica (HOLGATE, 2012). Esta reação é denominada reação de hipersensibilidade tipo I. A condição atópica, é detectada pelo teste cutâneo de punctura (SPT) e presença de IgE alérgeno-específica (BOUSQUET; ANTO; BACHERT; BAIARDINI *et al.*, 2020; BROZEK; BOUSQUET; AGACHE; AGARWAL *et al.*, 2017).

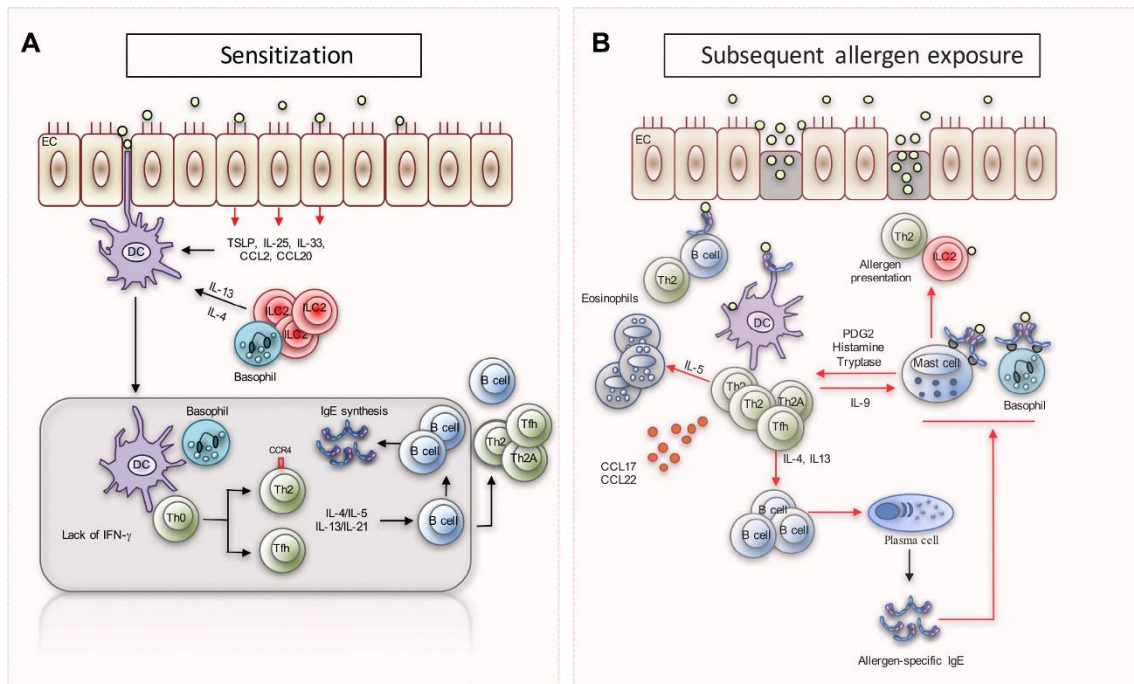
A asma alérgica é uma doença crônica das vias aéreas que provoca obstrução do fluxo aéreo associada à inflamação das vias aéreas, induzindo um quadro de hiper-reatividade brônquica e conseqüentemente episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse (NABE, 2020). Considerada uma doença heterogênea, altamente poligênica com diversas variantes de risco, sendo influenciada pela diminuição da exposição a antígenos microbianos e agentes infecciosos entre eles os aeroalérgenos, impulsionado pelo aumento da urbanização (BOWEN; KELLY; LEE; LAVENDER, 2008; VIRCHOW, 2019).

Em contrapartida, a rinite alérgica é uma patologia inflamatória das vias aéreas superiores, induzida pela exposição a aeroalérgenos, que, após sensibilização, desencadeia uma resposta inflamatória mediada por IgE semelhante à da asma (BOUSQUET; ANTO; BACHERT; BAIARDINI *et al.*,

2020). Entre as doenças respiratórias crônicas, a rinite alérgica é a que tem maior prevalência, afetando 10 a 20% da população mundial (BROZEK; BOUSQUET; AGACHE; AGARWAL *et al.*, 2017). Apesar de apresentar perfil imunológico, epidemiológico e fisiopatológico semelhante à asma, a rinite alérgica distingue-se por sintomas clássicos como: obstrução, prurido nasal, rinorréia aquosa, espirros e coceira (NABE, 2020). Além desses sintomas, os extranasais, como prurido ocular e faríngeo também podem estar presentes (BOUSQUET; ANTO; BACHERT; BAIARDINI *et al.*, 2020).

Os mecanismos das doenças alérgicas respiratórias são semelhantes, em indivíduos atópicos, com padrão de inflamação impulsionado por mecanismos dependentes do anticorpo IgE. Na fase de sensibilização, os aeroalérgenos passam pelo epitélio nasal e as células epiteliais ativadas liberam CCL2 e CCL20 (quimiocinas que induzem a mobilização de cálcio e a quimiotaxia), que recrutam células dendríticas imaturas (Figura 1. A). Entrando em contato com o alérgeno as células dendríticas ativam, migram para os linfonodos de drenagem regional, onde, no contexto das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, apresentam os peptídeos derivados do alérgeno às células T naives. A migração das células dendríticas é iniciada por IL-13 produzida por ILC2s e por IL-4 produzida principalmente por basófilos. Dentro do centro germinativo do linfonodo, um subconjunto de células Th se diferencia em células T foliculares auxiliares (Tfh). As células Tfh produzem IL-4 e IL-21 que, juntamente com a IL-4 derivada de células Th2, promovem a troca de classe de imunoglobulina da cadeia pesada para IgE nas células B. A IgE é distribuída de forma sistêmica, passa a ter acesso ao fluido intersticial, e IgE específica ou não específica se liga aos receptores de alta afinidade (FcεRI) dos mastócitos, basófilos e de baixa afinidade (FcεRII) de eosinófilos, linfócitos B, macrófagos ativados, células dendríticas foliculares e plaquetas (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; HAMS; LOCKSLEY; MCKENZIE; FALLON, 2013; SHAMJI; DURHAM, 2017)

Figura 1- Representação esquemática do mecanismo de inflamação alérgica. A e B, resumo da resposta imunológica aos estímulos iniciais, sensibilização alérgica e inflamação alérgica após reexposição a alérgenos.



Fonte: GALLI et al., 2008.

Durante a exposição subsequente ao alérgeno, o reconhecimento é facilitado por IgE específicas para o mesmo alérgeno, que se encontram ligadas ao receptor FcεRI de alta afinidade (cross-linking) na superfície das células efetoras, levando a uma cascata de sinalização que culmina na liberação de vários mediadores celulares, incluindo histamina, leucotrienos, prostaglandinas, proteases e citocinas (Figura 1), mediadores responsáveis pela reação de hipersensibilidade imediata tipo 1. A exposição frequente ao aeroalérgeno ocasiona inflamação crônica que culmina no espessamento dos bronquíolos, aumento da produção de muco, fibrose e remodelamento brônquico (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; SHAMJI; DURHAM, 2017). Outras citocinas, como a IL-5, secretadas pelas células Th2, e ativas os eosinófilos, um tipo de célula que é abundante em reações de hipersensibilidade tipo I e IV (KIM; ELLIS; FISCHER; NOSEWORTHY *et al.*, 2017; TAKATSU; NAKAJIMA, 2008). Já a IL-13 estimula as células epiteliais a secretar quantidades aumentadas de muco, característica comum das reações imediatas de hipersensibilidade tipo I em mucosas (KIM; ELLIS; FISCHER; NOSEWORTHY *et al.*, 2017)

Dermatophagoides pteronyssinus E SEUS ALÉRGENOS

A exposição ambiental a poluentes do ar e a aeroalérgenos tem sido relacionada como causas potencial para o aumento acentuado da prevalência de condições alérgicas nos últimos 70 anos (RIDER; YAMAMOTO; GUNTHER; HIROTA *et al.*, 2016). Aeroalérgenos, alérgenos transportados pelo ar, são amplamente distribuídos no ambiente, uma vez que fazem parte da composição de diversos organismos (SMITS; VAN DER VLUGT; VON MUTIUS; HIEMSTRA, 2016). São compostos de proteínas relativamente pequenas, solúveis em meio aquoso, propriedades que facilitam a dispersão no muco e conseqüentemente a passagem pela membrana basal epitelial transporte aos linfonodos regionais, desencadeando a resposta imunológica (LANTZ; PAUL, 1999; ROSARIO-FILHO; JACOB; SOLE; CONDINO-NETO *et al.*, 2013; SMITS; VAN DER VLUGT; VON MUTIUS; HIEMSTRA, 2016). Os aeroalérgenos possuem enzimas que podem acionar receptores ativados por proteases (NARLA; SILVERBERG, 2020). Alguns autores documentam que a sensibilização a alérgenos inalantes domiciliares, especialmente os ácaros da poeira doméstica, são importantes preditores de alergias respiratórias (ROSARIO-FILHO; JACOB; SOLE; CONDINO-NETO *et al.*, 2013; SIERRA-HEREDIA; NORTH; BROOK; DALY *et al.*, 2018). Além dos alérgenos dos ácaros provocarem sintomas por inalação (rinite, asma), podem ocasionar sintomas por contato externo direto (conjuntivite, eczema) e ingestão (urticária, anafilaxia) em pessoas sensibilizadas (GHOSH; DUTTA; PODDER; MONDAL *et al.*, 2018).

Ácaros da poeira domiciliar são animais microscópicos, com tamanho entre 100 a 400 μm , possuem corpo ovóide, com quatro pares de pernas (nas fases pós-larvais) articuláveis, esqueleto externo, corpo não segmentado. O ciclo de vida normalmente passa pelos estágios de ovo, larva, protoninfa, tritoinfa e adulto (MILIAN; DIAZ, 2004; PIKE; CUNNINGHAM; LESTER, 2005). Podem sofrer variações de acordo com a espécie e também devido às condições abióticas, as quais influenciam fortemente na dinâmica da população (PIKE; CUNNINGHAM; LESTER, 2005). A umidade e a temperatura são os fatores mais preponderantes, determinando com isso diferenças geográficas e sazonais na

prevalência e concentração de determinadas espécies de ácaros (BOQUETE; IRAOLA; FERNANDEZ-CALDAS; ARENAS VILLAROEL *et al.*, 2006). Mais de 48.000 espécies de ácaros já foram descritas (HALLIDAY; O'CONNOR; BAKER, 2000) e aproximadamente 40 espécies de importância médica foram encontradas na poeira doméstica (FISCHER; WALTON, 2014; YONG; JEONG, 2009). Os ácaros pertencentes a família *Pyroglyphidae*, desempenham um papel significativo em vários distúrbios alérgicos (PODDER; GUPTA; SAHA, 2010). O *Dermatophagoides pteronyssinus* e o *Dermatophagoides farinae* são dois dos principais piroglífídeos causadores de sensibilização em pacientes alérgicos (CALDERON; LINNEBERG; KLEINE-TEBBE; DE BLAY *et al.*, 2015).

Oficialmente 32 alérgenos de *D. pteronyssinus* (Tabela 1) já foram descritos, caracterizados e organizados em grupos (SILVA; PINHEIRO; PACHECO; ALCANTARA-NEVES, 2020). Os alérgenos dos grupos 1, 2 e 23 são considerados os mais importantes clinicamente (SILVA; PINHEIRO; PACHECO; ALCANTARA-NEVES, 2020). Estudos em determinadas populações, apontam que os níveis de sensibilização de sIgE à *D. pteronyssinus*, variaram de 72,1% para nDer p 1, 81,7% para nDer p 2 e 70,9% para r0Drp 23 (KOWAL; PAMPUCH; SIERGIEJKO; SIERGIEJKO *et al.*, 2020). Já um outro estudo analisou os níveis de IgE em amostras de soros de 191 pacientes jovens (0-20 anos), desses 77%, 61% e 50% eram positivas para Der p 2, Der p 1 e Der p 23, respectivamente (POSA, D.; PERNA, S.; RESCH, Y.; LUPINEK, C. *et al.*, 2017). Atualmente, assume-se que alérgenos com altas frequências de ligação de IgE (>50%) são relevantes, enquanto aqueles com baixas frequências (<50%) são consideradas alérgenos “menores”. Em geral, alérgenos com alta frequência de ligação a IgE, induzem fortes respostas de IgE tornando o principal critério para decidir o impacto clínico dos alérgenos (CARABALLO; VALENTA; PUERTA; POMES *et al.*, 2020).

Der p 1 é uma glicoproteína encontrada nas fezes dos ácaros, com peso molecular de 25 kDa e função de uma cisteína protease que parece aumentar seletivamente a resposta de IgE, condicionando as células T a produzir mais IL-4 e menos IFN- γ , e pode destruir a função da barreira do epitélio brônquico, por romper as moléculas transmembranas, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (ASOKANANTHAN; GRAHAM; STEWART; BAKKER *et al.*, 2002; FERNANDEZ-CALDAS; PUERTA; CARABALLO, 2014). Uma alta atividade

alergênica foi demonstrada para este componente usando diferentes ensaios, incluindo testes de provocação *in vivo* e *in vitro* (BOUAZIZ; WALGRAFFE; BOUILLOT; HERMAN *et al.*, 2015; BURTIN; CHABRE; OLAGNIER; DIDIERLAURENT *et al.*, 2009; TAKAI; KATO; YASUEDA; OKUMURA *et al.*, 2005) e sua sensibilização está associada à asma (POSA, DANIELA; PERNA, SERENA; RESCH, YVONNE; LUPINEK, CHRISTIAN *et al.*, 2017; RESCH; MICHEL; KABESCH; LUPINEK *et al.*, 2015; SCOBIE; RAVINDRAN; DEAM; THOMAS *et al.*, 1994). Os níveis de IgE para Der p 1 são significativamente maiores em crianças asmáticas e o anticorpo IgE para Der p 1 em crianças com menos de 5 anos é um fator de risco para o desenvolvimento de asma (POSA, DANIELA; PERNA, SERENA; RESCH, YVONNE; LUPINEK, CHRISTIAN *et al.*, 2017; RESCH; MICHEL; KABESCH; LUPINEK *et al.*, 2015). Estudos sugerem que a diminuição dos níveis de Der p 1 e Der p 2 está associada à melhora dos sintomas de asma em pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (MAESTRELLI; ZANOLLA; PUCCINELLI; POZZAN *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Lista oficial dos alérgenos de *D. pteronyssinus* de acordo com a composição bioquímica e massa molecular em quilo Dalton (kDa), aprovada pelo Subcomitê de Nomenclatura Alergênica da Organização Mundial da Saúde e da *International Union of Immunological Societies* (OMS / IUIS).

Alérgeno	Função Bioquímica	Peso Molecular (kDa)
Der p 1	Cisteíno protease	25 kDa
Der p 2	Família NPC2	15 kDa
Der p 3	Tripsina	31 kDa
Der p 4	Alfa amilase	60 kDa
Der p 5	<i>Não determinado</i>	14 kDa
Der p 6	Quimotripsina	25 kDa
Der p 7	Proteína semelhante ao aumento da permeabilidade bactericida	26, 30 e 31 kDa
Der p 8	Glutationa S-transferase	27 kDa
Der p 9	Serina protease colagenolítica	29 kDa
Der p 10	Tropomiosina	36 kDa
Der p 11	Paramiosina	103 kDa
Der p 13	Proteína de ligação a ácidos graxos citosólicos	15 kDa

Tabela 2 – Lista oficial dos alérgenos de *D. pteronyssinus* de acordo com a composição bioquímica e massa molecular em quilo Dalton (kDa), aprovada pelo Subcomitê de Nomenclatura Alergênica da Organização Mundial da Saúde e da *International Union of Immunological Societies* (OMS / IUIS).

(Conclusão).

Alérgeno	Função Bioquímica	Peso Molecular (kDa)
Der p 14	Apolipoforina	177 kDa
Der p 15	Proteína semelhante à quitinase	58,8 e 61,4 kDa
Der p 18	Proteína de ligação à quitina	49,2 kDa
Der p 20	Arginina quinase	40 kDa
Der p 21	<i>Não determinado</i>	14,726 kDa
Der p 23	Domínio proteico semelhante à peritrofina (PF01607)	8 kDa
	Proteína de ligação biquinol-citocromo c redutase	13 kDa
Der p 24		
Der p 25	Triose-fosfato isomerase	27 kDa
Der p 26	Cadeia leve de miosina	14,1 kDa
Der p 28	Proteína de choque térmico (Hsp70)	45 kDa
Der p 29	Ciclofilina	27,7 kDa
Der p 30	Ferritina	12,1 kDa
Der p 31	Cofilin	16,8 kDa
Der p 32	Pirofosfatase inorgânica	45 kDa
Der p 33	Alfa-tubulina	44,2 kDa
Der p 36	<i>Não determinado</i>	23 kDa
Der p 37	Domínio de proteína petrotrófica	30 kDa
Der p 38	Enzima lítica bacteriana	15 kDa
Der p 39	Troponina C	18 kDa
Der p 40	Proteína semelhante à tioredoxina	12 kDa

Fonte: www.allergen.org 2019

Der p 2 é uma proteína procedente do corpo do ácaro, com função biológica relacionada com transporte de colesterol, pertence à família NPC2, é uma proteína estável ao calor e ao pH, com peso molecular de aproximadamente 15 kDa (JOHANNESSEN; SKOV; KASTRUP; KRISTENSEN *et al.*, 2005;

OVSYANNIKOVA; VAILES; LI; HEYMANN *et al.*, 1994). Der p 2 é uma proteína de fusão, com frequência de 90% de reconhecimento específico de IgE (PITNER; VRTALA; THOMAS; WEGHOFER *et al.*, 2004). Pacientes alérgicos a ácaros, em particular asmáticos, têm níveis elevados de anticorpos IgE específicos de Der p 2 (RESCH; MICHEL; KABESCH; LUPINEK *et al.*, 2015). Por muito tempo, Der p 1 e Der p 2 foram considerados os dois alérgenos mais importantes de *D. pteronyssinus*, sendo necessários para diagnóstico e imunoterapia. Contudo vários estudos indicaram que esses dois alérgenos não são suficientes para diagnosticar todos os pacientes sensibilizados por *D. pteronyssinus* (BECKER; SCHLEDERER; KRAMER; HAACK *et al.*, 2016; WEGHOFER; THOMAS; KRONQVIST; MARI *et al.*, 2008). Além disso, a imunoterapia como uma vacina à base de extrato de *D. pteronyssinus*, que continha principalmente Der p 1 e Der p 2, não foi bem-sucedida para todos os pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*, mas apenas para aqueles com sensibilização exclusiva a esses dois alérgenos (KUAN-WEI; ZIEGLMAYER; ZIEGLMAYER; LEMELL *et al.*, 2019).

Der p 23 é uma proteína de aproximadamente 8 kDa com homologia com domínios de ligação à quitina e é encontrada principalmente em membranas peritróficas ao redor do pellet fecal (WEGHOFER; GROTE; RESCH; CASSET *et al.*, 2013), foi recentemente caracterizada e classificada como um alérgeno importante (KOWAL; PAMPUCH; SIERGIEJKO; SIERGIEJKO *et al.*, 2020). Der p 23 é reconhecido por mais de 70% dos pacientes alérgicos aos ácaros da poeira domiciliar e exibe alta reatividade alergênica, conforme determinado por sua capacidade de induzir a ativação de basófilos dependente de IgE (WEGHOFER; GROTE; RESCH; CASSET *et al.*, 2013). Der p 23 é uma peritrofina e já foi relatado que as peritrofinas podem ativar diretamente o sistema imunológico inato (MIKA; GOH; HOLT; KEMP *et al.*, 2011). Embora apenas pequenas quantidades de Der p 23 estejam presentes nos pellets fecais e na poeira doméstica, a baixa exposição é suficiente para sensibilizar pacientes alérgicos e induzir níveis específicos de IgE comparáveis aos principais alérgenos. Além disso, vários pacientes foram sensibilizados apenas para Der p 23, mas não para Der p 1 ou Der p 2, mostrando assim a importância desse alérgeno (WEGHOFER; GROTE; RESCH; CASSET *et al.*, 2013).

IMUNOTERAPIA ALÉRGICO ESPECÍFICA

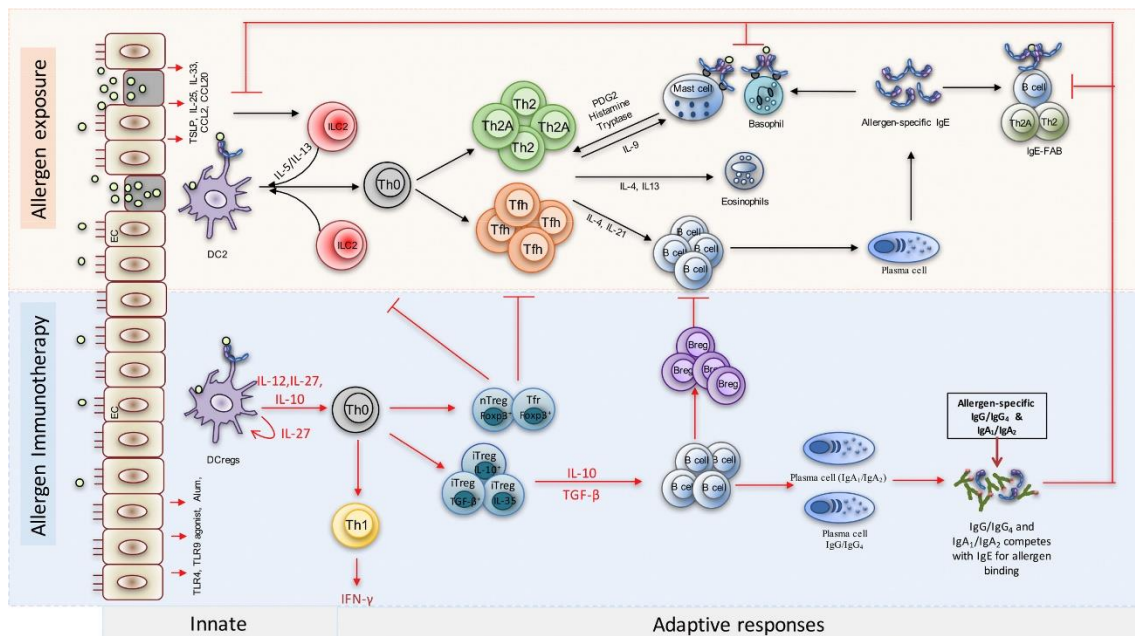
As formas atuais de tratamento para alergias respiratórias, baseiam-se na redução dos sintomas causados pela liberação de mediadores liberados pelos mastócitos e basófilos ou células-alvo envolvidas na inflamação alérgica da fase tardia (células T, eosinófilos) (BAGNASCO; FERRANDO; VARRICCHI; PASSALACQUA *et al.*, 2016). Além dos fármacos convencionais, tem-se usado anticorpo monoclonal humanizado, que impede a ligação da IgE aos seus receptores. Diversos anticorpos monoclonais já foram aprovados para uso em pacientes com asma alérgica grave não controlada pelo tratamento medicamentoso convencional (INCORVAIA; MAURO; RIARIO-SFORZA; FRATI *et al.*, 2008; OKAYAMA; MATSUMOTO; ODAJIMA; TAKAHAGI *et al.*, 2020).

Tanto a farmacoterapia quanto os anticorpos monoclonais, suprimem temporariamente os sintomas alérgicos, porém não afetam o curso da doença. A imunoterapia alérgico-específica (AIT) é o único tratamento para doenças alérgicas, capaz de impedir o início de novas sensibilizações alérgicas e da progressão da doença (DHAMI; KAKOUROU; ASAMOAH; AGACHE *et al.*, 2017; PFAAR; LOU; ZHANG; KLIMEK *et al.*, 2018; VIRCHOW, 2019). Resultando na melhora dos sintomas e diminuição da necessidade de farmacoterapia paliativa (GLOBINSKA; BOONPIYATHAD; SATITSUKSANOVA; KLEUSKENS *et al.*, 2018; PFAAR; ALVARO; CARDONA; HAMELMANN *et al.*, 2018; VIRCHOW, 2019). AIT consiste na administração de doses crescentes de um alérgico (ou extrato alergênico) a pacientes alérgicos com o fim de induzir uma resposta imunológica tolerogênica, e conseqüentemente induzir a melhora dos sintomas. O tempo de tratamento da AIT varia de três a cinco anos (BERINGS; KARAASLAN; ALTUNBULAKLI; GEVAERT *et al.*, 2017; KUCUKSEZER; OZDEMIR; CEVHERTAS; OGULUR *et al.*, 2020).

Os mecanismos de ação da imunoterapia, ainda não são totalmente compreendidos, e o uso de preparações heterogêneas de alérgicos, diferentes protocolos de tratamento e vias de administração dificultam ainda mais o processo de esclarecimentos (AKDIS; AKDIS, 2014). No entanto, sabe-se que durante a fase inicial de sensibilização em pacientes com rinite alérgica (Figura 2), a baixa exposição a alérgicos na superfície da mucosa nasal resulta na ativação de células epiteliais, que ativam as células dendríticas, que captam e

apresentam antígenos nas células T imaturas para induzir respostas alérgicas Th2, com apresentação de antígeno facilitada por IgE. A exposição subsequente ao alérgeno leva à degranulação de mastócitos e basófilos, causando reações clássicas da fase inicial. A infiltração subsequente de outros leucócitos leva à inflamação alérgica da fase tardia. Exposição a altas doses de alérgenos por imunoterapia restaura a função das células dendríticas, que produz principalmente IL-10 e TGF- β , promovendo um desvio imune de uma resposta Th2 para Th1 e indução de células Treg e Breg (incluindo outros subconjuntos de células B). A IL-10 induz mudanças do isotipo da IgE específica para IgG4 específica, que se liga ao alérgeno antes do mesmo formar o crosslinking com a IgE presente nos receptores de alta afinidade das células efetoras, agindo assim como um anticorpo bloqueador. O TGF- β foi associado não só com a inibição da proliferação e diferenciação das células B, mas também com a diminuição da produção de imunoglobulinas, exceto de IgA específica para alérgeno. TGF- β ainda está envolvida na indução de fibrose, contribuindo para o remodelamento brônquico (AKDIS; AKDIS, 2014; OJIAKU; YOO; PANETTIERI, 2017; SHAMJI; DURHAM, 2017).

Figura 2- Mecanismos da imunoterapia alérgeno específica.



Fonte: GALLI et al., 2008.

As principais vantagens da AIT são os efeitos modificadores do curso da doença e os efeitos duradouros da resposta imune protetora obtidos, os quais podem ser alcançados através da administração de uma vacina terapêutica. A AIT é geralmente mais eficaz na redução dos sintomas e demonstrou ser mais econômica quando comparado com o uso da farmacoterapia e dos anticorpos monoclonais (COX, 2016). No entanto, a abordagem inicial utilizando extratos brutos diluídos, ainda em uso pela maioria dos médicos, apresenta desvantagens já descritas em diversas publicações (AKDIS; AKDIS, 2015; FERREIRA; WOLF; WALLNER, 2014; WALLNER; PICHLER; FERREIRA, 2013), inclusive nas recentes prospecções tecnológicas realizadas por nosso grupo (FERNANDES; SILVA; PACHECO; ALCÂNTARA-NEVES *et al.*, 2021; SILVA; PINHEIRO; QUINTELLA; FERREIRA *et al.*, 2016; SILVA; PINHEIRO; PACHECO; ALCANTARA-NEVES, 2020). Entre tais desvantagens, tem-se: (i) a composição molecular de extratos brutos pode variar entre as várias fontes e lotes; (ii) dificuldades na padronização do extrato; (iii) risco de indução de efeitos secundários anafiláticos; (iv) indução de novas sensibilizações de IgE; (v) ausência de importantes alérgenos em extratos comercialmente disponíveis; (vi), dificuldade para definir a potência exata de extratos; (vii) a ligação da IgE total ao extrato ou a ligação da IgE aos alérgenos maiores não podem ser quantificadas de forma satisfatória e (viii) a imunoterapia com extrato necessita ser realizada em clínicas sob a supervisão da equipe médica (BERINGS; KARAASLAN; ALTUNBULAKLI; GEVAERT *et al.*, 2017; BESH; BESH; SOROKOPUD; KONDRATIUK *et al.*, 2018; SILVA; PINHEIRO; QUINTELLA; FERREIRA *et al.*, 2016; SILVA; PINHEIRO; PACHECO; ALCANTARA-NEVES, 2020).

Na tentativa de melhorar os protocolos da AIT, novas abordagens e formulações utilizando engenharia genética tem sido propostas. Com base no conhecimento detalhado das sequências proteicas, estruturas secundárias e características imunológicas dos alérgenos. Técnicas de biologia molecular permitem a produção de alérgenos recombinantes bem caracterizados, com atividade biológica conhecida (JONGEJAN; VAN REE; POULSEN, 2016; JUTEL; KOSOWSKA; SMOLINSKA, 2016; SILVA; PINHEIRO; QUINTELLA; FERREIRA *et al.*, 2016; WAI; LEUNG; LEUNG; CHU, 2017). Além disso, a engenharia genética permite a modificação de alérgenos do tipo selvagem para gerar

derivados de alérgenos com reatividade reduzida à IgE (hipoalérgenos), os quais apresentam risco reduzido de desencadear reações alérgicas indesejáveis durante o curso da imunoterapia, além de induzir uma resposta de células T eficiente e imunoprotetora de longa duração (DA SILVA; AGLAS; PINHEIRO; DE ANDRADE BELITARDO *et al.*, 2020a).

HIPOALÉRGENOS RECOMBINANTES

A principal característica de uma proteína hipoalergênica é a reatividade reduzida à IgE a partir de uma modificação na estrutura da molécula selvagem. Com isso, o ideal é que o hipoalérgeno apresente uma boa indução de proliferação de células T semelhante aos alérgenos nativos, seguido da redução da capacidade de indução da degranulação de células efectoras, e um aumento da produção de anticorpos IgG bloqueadores específicos para alérgenos, em particular IgG4 (DA SILVA; AGLAS; PINHEIRO; DE ANDRADE BELITARDO *et al.*, 2020a). Diversas abordagens moleculares podem ser empregadas para realização das modificações na estrutura da molécula hipoalergênica. As mais utilizadas são: a fragmentação ou fusão de moléculas, mutações pontuais, mosaicos e uso de peptídeos sintéticos não alergênicos compreendendo o repertório de epítopos de células T (BHATTACHARYA; SIRCAR; DASGUPTA; GUPTA BHATTACHARYA, 2018; HUANG; CURIN; BANERJEE; CHEN *et al.*, 2019).

As proteínas multicomponentes ou híbridas são criadas juntando as informações genéticas de pelo menos duas proteínas diferentes, podendo conter partes ou as proteínas originais completas. As moléculas híbridas são ideais para a produção de candidatos a vacina para organismos como os ácaros da poeira doméstica, pólen de grama ou veneno de insetos, os quais apresentam vários alérgenos importantes. As proteínas híbridas podem ser produzidas de forma a aumentar a imunogenicidade, reduzindo o número de moléculas que precisam ser produzidas para serem incluídas em uma formulação vacinal além disso, existe a possibilidade de exclusão ou inclusão de regiões conservadas de

alérgenos (LINHART; FOCKE-TEJKL; WEBER; NARAYANAN *et al.*, 2015; SILVA; PINHEIRO; PACHECO; ALCANTARA-NEVES, 2020). Recentemente, nosso grupo desenvolveu uma proteína híbrida hipoalergênica dos alérgenos Blo t 5/Blo t 21 do ácaro *Blomia tropicalis*, com potencial a ser usada para combater reações alérgicas causadas por este ácaro, rendendo uma prospecção tecnológica (DA SILVA; AGLAS; PINHEIRO; DE ANDRADE BELITARDO *et al.*, 2020a).

As abordagens que visam epítomos de células T específicas de alérgenos com peptídeos sintéticos são baseadas principalmente em pequenos peptídeos com menos de 20 aminoácidos para evitar a sensibilização de IgE, reconhecimento de IgE e efeitos colaterais associados (HUANG; CURIN; BANERJEE; CHEN *et al.*, 2019). Uma série de ensaios clínicos já demonstraram que alérgenos hipoalergênicos baseados em epítomos de células T podem compor formulações terapêuticas seguras e eficazes para AIT. Trabalhos com híbridos dos três alérgenos principais do veneno de abelha, Api m 1, 2 e 3, onde o autor preservou epítomos de células T e subtraiu os epítomos de células B de todos os três alérgenos, e mostraram que a molécula híbrida passou a ter uma reatividade de IgE, capacidade de ligação em mastócitos e basófilos humanos, altamente reduzida (KARAMLOO; SCHMID-GRENDELMEIER; KUSSEBI; AKDIS *et al.*, 2005). Em um outro trabalho, autores produziram uma molécula híbrida de Der p 1 e Der p 2, a qual foi capaz de induzir uma resposta reduzida no nível do SPT (do inglês, *Skin Prick Test*), e aumentar a proliferação de células T quando comparadas aos alérgenos naturais (CHAISRI; TUNGTRONGCHITR; INDRAWATTANA; MEECHAN *et al.*, 2017). Mesmo após todos esses estudos nenhuma dessas moléculas encontram-se comercialmente disponíveis para utilização em uma formulação vacinal, mostrando que esse ainda é um campo de pesquisa que ainda necessita inovação e investimento.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Produzir uma proteína híbrida hipoalergênica baseada nos principais alérgenos do ácaro de poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* para utilização em imunoterapia nas doenças alérgicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as sequências peptídicas de epítomos de Células T para os alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23.
- Desenvolver a partir de epítomos de Células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 uma proteína híbrida multicomponente (rDer p2231) com potencial hipoalergênico.
- Predizer as estruturas secundárias e terciárias da proteína rDer p 2231.
- Induzir a produção heteróloga, purificar e avaliar a purificação da proteína rDer p 2231 e do alérgeno rDer p 1 (controle).
- Avaliar o efeito do rDer p 2231 sobre a produção de 18 citocinas detectadas simultaneamente usando um painel multiplex de citocinas/quimiocinas em indivíduos atópicos e não atópicos.
- Caracterizar imunologicamente a proteína rDer p 2231 e seus respectivos controles.
- Testar o potencial terapêutico do hipoalérgeno rDer p 2231 em um modelo murino agudo de alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*.
- Testar o potencial terapêutico e de remodelamento do hipoalérgeno rDer p 2231 em modelo murino crônico de alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGACHE, I.; LAU, S.; AKDIS, C. A.; SMOLINSKA, S. *et al.* EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: House dust mite-driven allergic asthma. **Allergy**, 74, n. 5, p. 855-873, May 2019.
- AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Advances in allergen immunotherapy: aiming for complete tolerance to allergens. **Sci Transl Med**, 7, n. 280, p. 280ps286, Mar 25 2015.
- AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. **J Allergy Clin Immunol**, 133, n. 3, p. 621-631, Mar 2014.
- ASOKANANTHAN, N.; GRAHAM, P. T.; STEWART, D. J.; BAKKER, A. J. *et al.* House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. **The Journal of Immunology**, 169, n. 8, p. 4572-4578, 2002.
- BAGNASCO, D.; FERRANDO, M.; VARRICCHI, G.; PASSALACQUA, G. *et al.* A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma. **Int Arch Allergy Immunol**, 170, n. 2, p. 122-131, 2016.
- BECKER, S.; SCHLEDERER, T.; KRAMER, M. F.; HAACK, M. *et al.* Real-life study for the diagnosis of house dust mite allergy-the value of recombinant allergen-based IgE serology. **International archives of allergy and immunology**, 170, n. 2, p. 132-137, 2016.
- BERINGS, M.; KARAASLAN, C.; ALTUNBULAKLI, C.; GEVAERT, P. *et al.* Advances and highlights in allergen immunotherapy: On the way to sustained clinical and immunologic tolerance. **J Allergy Clin Immunol**, 140, n. 5, p. 1250-1267, Nov 2017.
- BESH, O. M.; BESH, D. I.; SOROKOPUD, O. O.; KONDRATIUK, M. O. *et al.* ASIT therapy: advantages and adverse effects. own results and literature data. **Wiad Lek**, 71, n. 2 pt 1, p. 341-345, 2018.
- BHATTACHARYA, K.; SIRCAR, G.; DASGUPTA, A.; GUPTA BHATTACHARYA, S. Spectrum of Allergens and Allergen Biology in India. **Int Arch Allergy Immunol**, 177, n. 3, p. 219-237, 2018.
- BOQUETE, M.; IRAOLA, V.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; ARENAS VILLAROEL, L. *et al.* House dust mite species and allergen levels in Galicia, Spain: a cross-sectional, multicenter, comparative study. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 16, n. 3, p. 169-176, 2006.
- BOUAZIZ, A.; WALGRAFFE, D.; BOUILLOT, C.; HERMAN, J. *et al.* Development of recombinant stable house dust mite allergen Der p 3 molecules for component-resolved diagnosis and specific immunotherapy. **Clinical & Experimental Allergy**, 45, n. 4, p. 823-834, 2015.
- BOUSQUET, J.; ANTO, J. M.; BACHERT, C.; BAIARDINI, I. *et al.* Allergic rhinitis. **Nat Rev Dis Primers**, 6, n. 1, p. 95, Dec 3 2020.
- BOWEN, H.; KELLY, A.; LEE, T.; LAVENDER, P. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. **Clin Exp Allergy**, 38, n. 9, p. 1422-1431, Sep 2008.
- BROZEK, J. L.; BOUSQUET, J.; AGACHE, I.; AGARWAL, A. *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. **J Allergy Clin Immunol**, 140, n. 4, p. 950-958, Oct 2017.

- BURTIN, D.; CHABRE, H.; OLAGNIER, B.; DIDIERLAURENT, A. *et al.* Production of native and modified recombinant Der p 1 molecules in tobacco plants. **Clinical & Experimental Allergy**, 39, n. 5, p. 760-770, 2009.
- CAFFARELLI, C.; MASTRORILLI, C.; PROCACCIANTI, M.; SANTORO, A. Use of Sublingual Immunotherapy for Aeroallergens in Children with Asthma. **J Clin Med**, 9, n. 10, Oct 21 2020.
- CALDERON, M. A.; LINNEBERG, A.; KLEINE-TEBBE, J.; DE BLAY, F. *et al.* Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? **J Allergy Clin Immunol**, 136, n. 1, p. 38-48, Jul 2015.
- CARABALLO, L.; VALENTA, R.; PUERTA, L.; POMES, A. *et al.* The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. **World Allergy Organ J**, 13, n. 5, p. 100118, May 2020.
- CHAISRI, U.; TUNGTRONGCHITR, A.; INDRAWATTANA, N.; MEECHAN, P. *et al.* Immunotherapeutic efficacy of liposome-encapsulated refined allergen vaccines against Dermatophagoides pteronyssinus allergy. **PLoS One**, 12, n. 11, p. e0188627, 2017.
- CIRIACO, M.; VENTRICE, P.; RUSSO, G.; SCICCHITANO, M. *et al.* Corticosteroid-related central nervous system side effects. **J Pharmacol Pharmacother**, 4, n. Suppl 1, p. S94-98, Dec 2013.
- COX, L. The role of allergen immunotherapy in the management of allergic rhinitis. **Am J Rhinol Allergy**, 30, n. 1, p. 48-53, Jan-Feb 2016.
- DA SILVA, D. R.; BINOTTI, R. S.; DA SILVA, C. M.; DE OLIVEIRA, C. H. *et al.* Mites in dust samples from mattress surfaces from single beds or cribs in the south Brazilian city of Londrina. **Pediatr Allergy Immunol**, 16, n. 2, p. 132-136, Mar 2005.
- DA SILVA, E. S.; AGLAS, L.; PINHEIRO, C. S.; DE ANDRADE BELITARDO, E. M. M. *et al.* A hybrid of two major Blomia tropicalis allergens as an allergy vaccine candidate. **Clin Exp Allergy**, 50, n. 7, p. 835-847, Jul 2020.
- DAMASCENO, E.; COSTA-CARVALHO, B. T.; SOLÉ, D.; WANDALSEN, G. F. Direct and indirect costs of asthma: a review. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, 35, n. 6, p. 234-240, 2012.
- DHAMI, S.; KAKOUROU, A.; ASAMOAH, F.; AGACHE, I. *et al.* Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. **Allergy**, 72, n. 12, p. 1825-1848, Dec 2017.
- FERNANDES, A. S. F.; SILVA, E. S.; PACHECO, L. G. C.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M. *et al.* **Processo de construção e produção de proteína quimérica recombinante hipoalergênica a partir de epítomos de células T dos alérgenos dos grupos 1, 2 e 23 do ácaro Dermatophagoides pteronyssinus, para uso profilático e tratamento de doenças alérgicas.** INPI. Brasil: Universidade Federal da Bahia. BR 10 2021 008111 2 2021.
- FERNANDEZ-CALDAS, E.; PUERTA, L.; CARABALLO, L. Mites and allergy. **Chem Immunol Allergy**, 100, p. 234-242, 2014.
- FERREIRA, F.; WOLF, M.; WALLNER, M. Molecular approach to allergy diagnosis and therapy. **Yonsei Med J**, 55, n. 4, p. 839-852, Jul 2014.
- FISCHER, K.; WALTON, S. Parasitic mites of medical and veterinary importance--is there a common research agenda? **Int J Parasitol**, 44, n. 12, p. 955-967, Oct 15 2014.

- FONSECA, L. F. Prevalência de asma brônquica, rinite alérgica e eczema em crianças escolarizadas no concelho de Setúbal. **Rev Port Imunoalergologia**, 16, n. 6, p. 553-571, 2008.
- FRANCO, R.; NASCIMENTO, H. F.; CRUZ, A. A.; SANTOS, A. C. *et al.* The economic impact of severe asthma to low-income families. **Allergy**, 64, n. 3, p. 478-483, Mar 2009.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, 454, n. 7203, p. 445-454, Jul 24 2008.
- GHOSH, A.; DUTTA, S.; PODDER, S.; MONDAL, P. *et al.* Sensitivity to House Dust Mites Allergens with Atopic Asthma and Its Relationship with CD14 C(-159T) Polymorphism in Patients of West Bengal, India. **J Med Entomol**, 55, n. 1, p. 14-19, Jan 10 2018.
- GLOBINSKA, A.; BOONPIYATHAD, T.; SATITSUKSANOA, P.; KLEUSKENS, M. *et al.* Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Diverse mechanisms of immune tolerance to allergens. **Ann Allergy Asthma Immunol**, 121, n. 3, p. 306-312, Sep 2018.
- HALLIDAY, R.; O'CONNOR, B.; BAKER, A. Global diversity of mites. 2000.
- HAMS, E.; LOCKSLEY, R. M.; MCKENZIE, A. N.; FALLON, P. G. Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. **J Immunol**, 191, n. 11, p. 5349-5353, Dec 1 2013.
- HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nat Med**, 18, n. 5, p. 673-683, May 4 2012.
- HOLT, P. G.; THOMAS, W. R. Sensitization to airborne environmental allergens: unresolved issues. **Nat Immunol**, 6, n. 10, p. 957-960, Oct 2005.
- HOSSNY, E.; ROSARIO, N.; LEE, B. W.; SINGH, M. *et al.* The use of inhaled corticosteroids in pediatric asthma: update. **World Allergy Organ J**, 9, p. 26, 2016.
- HOYNE, G. F.; O'HEHIR, R. E.; WRAITH, D. C.; THOMAS, W. R. *et al.* Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. **J Exp Med**, 178, n. 5, p. 1783-1788, Nov 1 1993.
- HUANG, H. J.; CURIN, M.; BANERJEE, S.; CHEN, K. W. *et al.* A hypoallergenic peptide mix containing T cell epitopes of the clinically relevant house dust mite allergens. **Allergy**, 74, n. 12, p. 2461-2478, Dec 2019.
- INCORVAIA, C.; MAURO, M.; RIARIO-SFORZA, G. G.; FRATI, F. *et al.* Current and future applications of the anti-IgE antibody omalizumab. **Biologics**, 2, n. 1, p. 67-73, Mar 2008.
- JOHANNESSEN, B. R.; SKOV, L. K.; KASTRUP, J. S.; KRISTENSEN, O. *et al.* Structure of the house dust mite allergen Der f 2: implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. **FEBS Lett**, 579, n. 5, p. 1208-1212, Feb 14 2005.
- JONGEJAN, L.; VAN REE, R.; POULSEN, L. K. Hypoallergenic molecules for subcutaneous immunotherapy. **Expert Rev Clin Immunol**, 12, n. 1, p. 5-7, 2016.
- JULIA, V.; MACIA, L.; DOMBROWICZ, D. The impact of diet on asthma and allergic diseases. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 5, p. 308-322, May 2015.
- JUTEL, M.; KOSOWSKA, A.; SMOLINSKA, S. Allergen Immunotherapy: Past, Present, and Future. **Allergy Asthma Immunol Res**, 8, n. 3, p. 191-197, May 2016.
- KANG, H. S.; RHEE, C. K.; LEE, H. Y.; YOON, H. K. *et al.* Different anti-remodeling effect of nilotinib and fluticasone in a chronic asthma model. **Korean J Intern Med**, 31, n. 6, p. 1150-1158, Nov 2016.

- KARAMLOO, F.; SCHMID-GRENDELMEIER, P.; KUSSEBI, F.; AKDIS, M. *et al.* Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. **Eur J Immunol**, 35, n. 11, p. 3268-3276, Nov 2005.
- KIM, H.; ELLIS, A. K.; FISCHER, D.; NOSEWORTHY, M. *et al.* Asthma biomarkers in the age of biologics. **Allergy Asthma Clin Immunol**, 13, p. 48, 2017.
- KOWAL, K.; PAMPUCH, A.; SIERGIEJKO, G.; SIERGIEJKO, Z. *et al.* Sensitization to major Dermatophagoides pteronyssinus allergens in house dust mite allergic patients from North Eastern Poland developing rhinitis or asthma. **Adv Med Sci**, 65, n. 2, p. 304-309, Sep 2020.
- KUAN-WEI, C.; ZIEGLMAYER, P.; ZIEGLMAYER, R.; LEMELL, P. *et al.* Selection of house dust mite-allergic patients by molecular diagnosis may enhance success of specific immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 143, n. 3, p. 1248, 2019.
- KUCUKSEZER, U. C.; OZDEMIR, C.; CEVHERTAS, L.; OGULUR, I. *et al.* Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and allergen tolerance. **Allergol Int**, 69, n. 4, p. 549-560, Oct 2020.
- LANTZ, C. G.; PAUL, W. *Fundamenta immunology*. 1999.
- LINHART, B.; FOCKE-TEJKL, M.; WEBER, M.; NARAYANAN, M. *et al.* Molecular evolution of hypoallergenic hybrid proteins for vaccination against grass pollen allergy. **J Immunol**, 194, n. 8, p. 4008-4018, Apr 15 2015.
- MACKENZIE, K. J.; FITCH, P. M.; LEECH, M. D.; ILCHMANN, A. *et al.* Combination peptide immunotherapy based on T-cell epitope mapping reduces allergen-specific IgE and eosinophilia in allergic airway inflammation. **Immunology**, 138, n. 3, p. 258-268, Mar 2013.
- MACKENZIE, K. J.; FITCH, P. M.; LEECH, M. D.; ILCHMANN, A. *et al.* Combination peptide immunotherapy based on T-cell epitope mapping reduces allergen-specific I g E and eosinophilia in allergic airway inflammation. **Immunology**, 138, n. 3, p. 258-268, 2013.
- MAESTRELLI, P.; ZANOLLA, L.; PUCCINELLI, P.; POZZAN, M. *et al.* Low domestic exposure to house dust mite allergens (Der p 1) is associated with a reduced non-specific bronchial hyper-responsiveness in mite-sensitized asthmatic subjects under optimal drug treatment. **Clin Exp Allergy**, 31, n. 5, p. 715-721, May 2001.
- MIKA, A.; GOH, P.; HOLT, D. C.; KEMP, D. J. *et al.* Scabies mite peritrophins are potential targets of human host innate immunity. **PLoS Negl Trop Dis**, 5, n. 9, p. e1331, Sep 2011.
- MILIAN, E.; DIAZ, A. M. Allergy to house dust mites and asthma. **P R Health Sci J**, 23, n. 1, p. 47-57, Mar 2004.
- MORAIS-ALMEIDA, M.; PITE, H.; AGUIAR, R.; ANSOTEGUI, I. *et al.* Asthma and the Coronavirus Disease 2019 Pandemic: A Literature Review. **Int Arch Allergy Immunol**, 181, n. 9, p. 680-688, 2020.
- NABE, T. Steroid-Resistant Asthma and Neutrophils. **Biol Pharm Bull**, 43, n. 1, p. 31-35, 2020.
- NARLA, S.; SILVERBERG, J. I. The Role of Environmental Exposures in Atopic Dermatitis. **Curr Allergy Asthma Rep**, 20, n. 12, p. 74, Oct 12 2020.
- OJIAKU, C. A.; YOO, E. J.; PANETTIERI, R. A., Jr. Transforming Growth Factor beta1 Function in Airway Remodeling and Hyperresponsiveness. The Missing Link? **Am J Respir Cell Mol Biol**, 56, n. 4, p. 432-442, Apr 2017.
- OKAYAMA, Y.; MATSUMOTO, H.; ODAJIMA, H.; TAKAHAGI, S. *et al.* Roles of omalizumab in various allergic diseases. **Allergol Int**, 69, n. 2, p. 167-177, Apr 2020.

- OVSYANNIKOVA, I. G.; VAILES, L. D.; LI, Y.; HEYMANN, P. W. *et al.* Monoclonal antibodies to group II Dermatophagoides spp. allergens: murine immune response, epitope analysis, and development of a two-site ELISA. **J Allergy Clin Immunol**, 94, n. 3 Pt 1, p. 537-546, Sep 1994.
- PAWANKAR, R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. **World Allergy Organ J**, 7, n. 1, p. 12, 2014.
- PFAAR, O.; ALVARO, M.; CARDONA, V.; HAMELMANN, E. *et al.* Clinical trials in allergen immunotherapy: current concepts and future needs. **Allergy**, 73, n. 9, p. 1775-1783, Sep 2018.
- PFAAR, O.; LOU, H.; ZHANG, Y.; KLIMEK, L. *et al.* Recent developments and highlights in allergen immunotherapy. **Allergy**, 73, n. 12, p. 2274-2289, Dec 2018.
- PIKE, A. J.; CUNNINGHAM, M. J.; LESTER, P. J. Development of Dermatophagoides pteronyssinus (Acari: Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions. **J Med Entomol**, 42, n. 3, p. 266-269, May 2005.
- PITNER, G.; VRTALA, S.; THOMAS, W.; WEGHOFER, M. *et al.* Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. **Clinical & Experimental Allergy**, 34, n. 4, p. 597-603, 2004.
- PODDER, S.; GUPTA, S. K.; SAHA, G. K. Incrimination of Blomia tropicalis as a Potent Allergen in House Dust and Its Role in Allergic Asthma in Kolkata Metropolis, India. **World Allergy Organ J**, 3, n. 5, p. 182-187, May 2010.
- POSA, D.; PERNA, S.; RESCH, Y.; LUPINEK, C. *et al.* Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 139, n. 2, p. 541-549. e548, 2017.
- POSA, D.; PERNA, S.; RESCH, Y.; LUPINEK, C. *et al.* Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. **J Allergy Clin Immunol**, 139, n. 2, p. 541-549 e548, Feb 2017.
- PRICKETT, S.; ROLLAND, J.; O'HEHIR, R. Immunoregulatory T cell epitope peptides: the new frontier in allergy therapy. **Clinical & Experimental Allergy**, 45, n. 6, p. 1015-1026, 2015.
- PRICKETT, S. R.; ROLLAND, J. M.; O'HEHIR, R. E. Immunoregulatory T cell epitope peptides: the new frontier in allergy therapy. **Clin Exp Allergy**, 45, n. 6, p. 1015-1026, Jun 2015.
- RESCH, Y.; MICHEL, S.; KABESCH, M.; LUPINEK, C. *et al.* Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and nonasthmatic children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 136, n. 4, p. 1083-1091, 2015.
- RIDER, C. F.; YAMAMOTO, M.; GUNTHER, O. P.; HIROTA, J. A. *et al.* Controlled diesel exhaust and allergen coexposure modulates microRNA and gene expression in humans: Effects on inflammatory lung markers. **J Allergy Clin Immunol**, 138, n. 6, p. 1690-1700, Dec 2016.
- ROSARIO-FILHO, N. A.; JACOB, C. M.; SOLE, D.; CONDINO-NETO, A. *et al.* Pediatric allergy and immunology in Brazil. **Pediatr Allergy Immunol**, 24, n. 4, p. 402-409, Jun 2013.
- SCOBIE, G.; RAVINDRAN, V.; DEAM, S.; THOMAS, M. *et al.* Expression cloning of a dust mite cysteine proteinase, Der p 1, a major allergen associated with asthma and hypersensitivity reactions. : Portland Press Ltd. 1994.

- SHAMJI, M. H.; DURHAM, S. R. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. **J Allergy Clin Immunol**, 140, n. 6, p. 1485-1498, Dec 2017.
- SIERRA-HEREDIA, C.; NORTH, M.; BROOK, J.; DALY, C. *et al.* Aeroallergens in Canada: Distribution, Public Health Impacts, and Opportunities for Prevention. **Int J Environ Res Public Health**, 15, n. 8, Jul 25 2018.
- SILVA, E. S.; PINHEIRO, C. S.; QUINTELLA, C. M.; FERREIRA, F. *et al.* Advances in patent applications related to allergen immunotherapy. **Expert Opin Ther Pat**, 26, n. 6, p. 657-668, Jun 2016.
- SILVA, E. S. D.; PINHEIRO, C. S.; PACHECO, L. G. C.; ALCANTARA-NEVES, N. M. Dermatophagoides spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? **Expert Opin Ther Pat**, 30, n. 3, p. 163-177, Mar 2020.
- SMITS, H. H.; VAN DER VLUGT, L. E.; VON MUTIUS, E.; HIEMSTRA, P. S. Childhood allergies and asthma: New insights on environmental exposures and local immunity at the lung barrier. **Curr Opin Immunol**, 42, p. 41-47, Oct 2016.
- SOLE, D.; MELO, K. C.; CAMELO-NUNES, I. C.; FREITAS, L. S. *et al.* Changes in the prevalence of asthma and allergic diseases among Brazilian schoolchildren (13-14 years old): comparison between ISAAC Phases One and Three. **J Trop Pediatr**, 53, n. 1, p. 13-21, Feb 2007.
- TAKAI, T.; KATO, T.; YASUEDA, H.; OKUMURA, K. *et al.* Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro-and mature Der p 1 and Der f 1: major conformational IgE epitopes blocked by prodomains. **Journal of allergy and clinical immunology**, 115, n. 3, p. 555-563, 2005.
- TAKATSU, K.; NAKAJIMA, H. IL-5 and eosinophilia. **Curr Opin Immunol**, 20, n. 3, p. 288-294, Jun 2008.
- TO, T.; STANOJEVIC, S.; MOORES, G.; GERSHON, A. S. *et al.* Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health**, 12, p. 204, Mar 19 2012.
- TO, T.; STANOJEVIC, S.; MOORES, G.; GERSHON, A. S. *et al.* Correction to: Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health**, 21, n. 1, p. 1809, Oct 8 2021.
- VALENTA, R.; CAMPANA, R.; FOCKE-TEJKL, M.; NIEDERBERGER, V. Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. **J Allergy Clin Immunol**, 137, n. 2, p. 351-357, Feb 2016.
- VIRCHOW, J. C. Allergen immunotherapy (AIT) in asthma. **Semin Immunol**, 46, p. 101334, Dec 2019.
- WAI, C. Y. Y.; LEUNG, N. Y. H.; LEUNG, P. S. C.; CHU, K. H. Immunotherapy of Food Allergy: a Comprehensive Review. **Clin Rev Allergy Immunol**, Sep 19 2017.
- WALLNER, M.; PICHLER, U.; FERREIRA, F. Recombinant allergens for pollen immunotherapy. **Immunotherapy**, 5, n. 12, p. 1323-1338, Dec 2013.
- WEGHOFER, M.; GROTE, M.; RESCH, Y.; CASSET, A. *et al.* Identification of Der p 23, a peritrophin-like protein, as a new major Dermatophagoides pteronyssinus allergen associated with the peritrophic matrix of mite fecal pellets. **J Immunol**, 190, n. 7, p. 3059-3067, Apr 1 2013.

WEGHOFER, M.; THOMAS, W.; KRONQVIST, M.; MARI, A. *et al.* Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. **European journal of clinical investigation**, 38, n. 12, p. 959-965, 2008.

YEPES-NUNEZ, J. J.; GOMEZ-GARCIA, C.; ESPINOSA-HERRERA, Y.; CARDONA-VILLA, R. Health-related quality of life in children and adults with respiratory allergy in Colombia: prospective study. **Allergol Immunopathol (Madr)**, 40, n. 6, p. 379-384, Nov-Dec 2012.

YONG, T. S.; JEONG, K. Y. Household arthropod allergens in Korea. **Korean J Parasitol**, 47 Suppl, p. S143-153, Oct 2009.

CAPÍTULO I

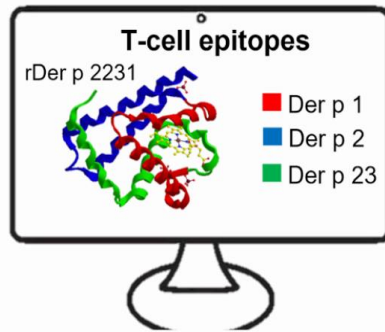
Manuscrito 01 – submetido na revista Clinical and Experimental Allergy
(Fator de impacto 5.018)

**Recombinant T-cell epitope conjugation: a new approach for
Dermatophagoides hypoallergen design**

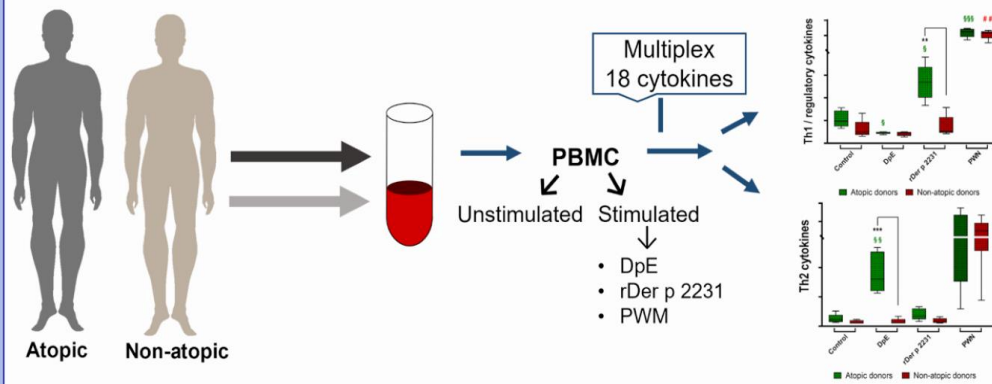
Graphical Abstract

Recombinant T-cell epitope conjugation: a new approach for *Dermatophagoides* hypoallergen design

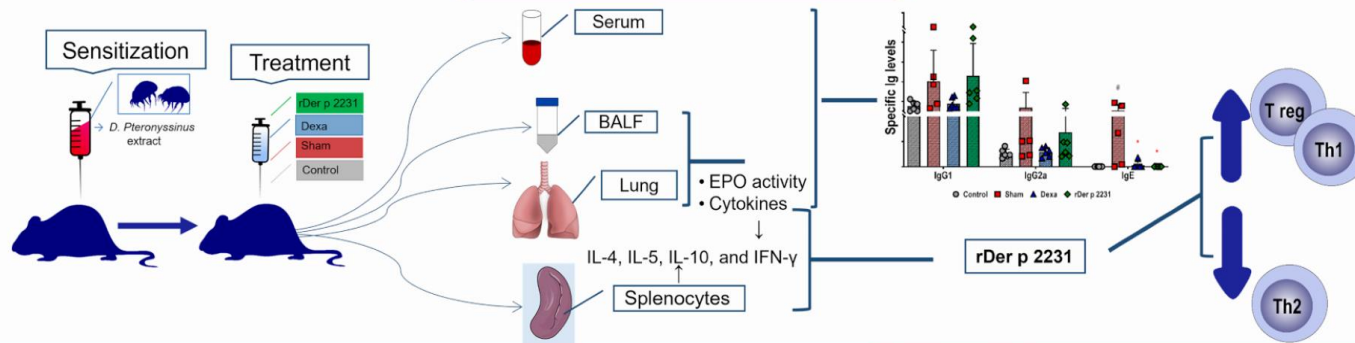
Construction of Hypoallergenic



Multiplex human cytokine/chemokine



Murine model of allergy



Highlights

- T cell epitopes from the Der p 1, Der p 2 and Der p 23 allergens of *Dermatophagoides* were used to construct the molecule named rDerp2231.
- PBMCs from atopic patients, stimulated with rDer p 2231, show an increase in regulatory and Th1 cytokines and a reduction in Th2.
- Mice allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and treated with rDer p 2231, showed higher levels of regulatory cytokines, Th1, IgG and lower levels of Th2 and IgE.

Abbreviations: BALF, bronchoalveolar lavage fluid; DpE, *D. pteronyssinus* extract; IFN- γ , Interferon-gamma; IL-4, Interleukin 4; IL-5, Interleukin 5; IL-10, Interleukin 10; PWM, pokeweed mitogen.

Recombinant T-cell epitope conjugation: a new approach for *Dermatophagoides* hypoallergen design

Antônio Márcio Santana Fernandes^{1,2}, Eduardo Santos da Silva¹, Elisânia Fontes Silveira¹, Emília Maria Medeiros de Andrade Belitardo¹, Leonardo Freire Santiago¹, Raphael Chagas Silva¹, Vitor dos Santos Alves¹, Deise Malta Carneiro¹, Fatima Ferreira³, Alain Jacquet⁴, Luis Gustavo Carvalho Pacheco^{1,2}, Neuza Maria Alcantara-Neves^{1,2}, Carina Silva Pinheiro^{1,2*}

¹Laboratório de Alergia e Acarologia, Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

²Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

³Department of Biosciences and Medical Biology, University of Salzburg, Salzburg, Austria

⁴Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

* Corresponding author's address: Laboratory of Allergy and Acarology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia. Avenida Reitor Miguel Calmon, S/n, Vale do Canela, CEP: 40110-100. Salvador, Bahia, Brazil. <https://orcid.org/0000-0001-5623-1308>. E-mail: carina.pinheiro@ufba.br

ORCID:

AMSF: <https://orcid.org/0000-0001-8839-3395>

ESS: <https://orcid.org/0000-0003-0247-9505>

EFS: <https://orcid.org/0000-0003-4936-5986>

EMMAB: <https://orcid.org/0000-0003-0818-1582>

LFS: <https://orcid.org/0000-0002-0085-1310>

RCS: <https://orcid.org/0000-0001-9717-3394>

VSA: <https://orcid.org/0000-0002-3828-7006>

DMC: <https://orcid.org/0000-0002-8062-4328>

FF: <https://orcid.org/0000-0003-0989-2335>

AJ: <https://orcid.org/0000-0002-0980-9741>

LGCP: <https://orcid.org/0000-0003-2500-0800>

NMAN: <https://orcid.org/0000-0002-2102-260X>

Other authors' e-mails:

AMSF: marciofernandes14@gmail.com

ESS: eduardossilva06@gmail.com

EFS: elissfontess@gmail.com

EMMAB: emilia_mandrade@hotmail.com

LFS: leonardofsantiago@gmail.com

RCS: raphaschagas@hotmail.com

VSA: alvesvitor@usp.br

DMC: dmalta1990@gmail.com

FF: fatima.ferreira@sbg.ac.at

AJ: Alain.J@chula.ac.th

LGCP: lgcpacheco@gmail.com

NMAN: neuzalcantara@gmail.com

Acknowledgments

This work was supported by grants from Bahia the Research Support Foundation (FAPESB) APP0004/2016, AMSF was recipient of a fellowship from FAPESB grant BOL0320/2018.

Abstract

Background:

Allergen-specific immunotherapy (AIT) is the only clinical approach that can potentially cure some allergic diseases by inducing immunological tolerance. *Dermatophagoides pteronyssinus* is considered as the most important source of mite allergens worldwide, with high sensitization rates for the major allergens Der p 1, Der p 2 and Der p 23. The aim of this work was to generate a hypoallergenic hybrid molecule containing T-cell epitopes from these three major allergens.

Methods:

The hybrid protein termed Der p 2231 containing T-cell epitopes was purified by affinity chromatography. The human IgE reactivity was verified by comparison to those of the parental allergens. The hybrid was also characterized immunologically through an *in vivo* mice model.

Results:

The hybrid rDer p 2231 stimulated in PBMCs isolated from atopic patients higher levels of IL-2, IL-10, IL-15 and IFN- γ , as well as lower levels of IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α and GM-CSF. The use of hybrid molecules as a therapeutic model in *D. pteronyssinus* allergic mice led to the reduction of IgE production and lower eosinophilic peroxidase activity in the airways. We found increased levels of IgG antibodies, which blocked the IgE binding to the parental allergens in the serum of atopic patients. Furthermore, the stimulation of splenocytes from mice treated with rDer p 2231 induced higher levels of IL-10 and IFN- γ and decreased the secretion of IL-4 and IL-5, when compared to parental allergens and *D. pteronyssinus* extract.

Conclusion:

rDer p 2231 has the potential to be used in AIT in patients co-sensitized with *D. pteronyssinus* major allergens, once it was able to reduce IgE production, inducing allergen-specific blocking antibodies, restoring and balancing Th1/Th2 immune responses, and inducing regulatory T-cells.

Keywords

Allergen-specific immunotherapy, *Dermatophagoides pteronyssinus*, Hypoallergen, Immunogenicity

Key Messages

- T-cell epitopes from the Der p 1, Der p 2 and Der p 23 allergens of the *Dermatophagoides* were used to construct the molecule termed rDerp2231;
- PBMCs from atopic patients, stimulated with rDer p 2231, show an increase in regulatory and Th1 cytokines and low secretion in Th2;
- Mice allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* treated with rDer p 2231 showed higher levels of regulatory cytokines, Th1, IgG and lower levels of Th2 and IgE.

1. INTRODUCTION

Allergen-specific immunotherapy (AIT) is the only clinical management of allergies that can control the progression of these immune-mediated diseases, by inducing immunological tolerance.^{1,2} Therapies with T-cell-targeted molecules can significantly impact the safety and efficacy of AIT, making them good alternatives to natural extracts.³ A series of clinical trials have already demonstrated that hypoallergenic T-cell epitope-based allergens can compose safe and effective therapeutic formulations for AIT. These studies involved allergens from cats, bees, birch pollen and house dust mites (HDM)³⁻¹³ Among the HDM, *Dermatophagoides pteronyssinus* is considered as an important source of allergic sensitization, being present in nearly 80% - 90% of house dust worldwide.¹⁴ In southern Brazil, this mite represents 72% to 84% of the total number of mites present in cribs and beds, respectively.¹⁵ Officially, 32 IgE-binding proteins from *D. pteronyssinus* (Der p) have already been documented by the WHO/IUIS allergen nomenclature sub-committee [www.allergen.org].¹⁶ Allergens in groups 1, 2, and 23 are the most clinically relevant. Frequency of specific IgE (sIgE) reached values of 72.1% for nDer p 1, 81.7% for nDer p 2 and 70.9% for rDerp 23.^{17,18} Hypoallergenic derivatives of these allergens have already been reported, but there are no reports to date of molecular or T-cell epitope-based mixtures for these three allergens in a hybrid form.⁸ In this study, we generated a hypoallergenic hybrid molecule based on T-cell epitopes of the Der p 1, Der p 2 and Der p 23 allergens that can be potentially used as an immunotherapeutic formulation to treat allergic reactions caused by the HDM *D. pteronyssinus*.

2. METHODS

2.1 Construction of hypoallergenic hybrid protein

Six hypoallergenic proteins were designed using dominant sequences from antigenic regions of T-cell epitopes of the Der p 1, Der p 2 and Der p 23 allergens. The sequences were retrieved from a study whose authors mapped 137 specific T-cell epitopes of *D. pteronyssinus*.¹⁹ The chosen sequences are shown in Figure 1A. Peptide linkers EAAAK and KK were used in the construction of the chimera to assist in obtaining molecule stability and flexibility.²⁰ The immunogenicity of the generated hybrids was predicted through analysis of MHC-II binding using the IEDB analysis resource Consensus tool (<https://www.iedb.org/>). The tertiary structures were modeled using the publicly available RaptorX server.²¹ The hybrid was chosen based on the number of functional domains, P-value and uGDT (GDT) and was termed rDer p 2231. The molecular model was visualized in the UCFS Chimera.

2.2 Heterologous expression and purification

The recombinant mature allergen rDer p 1 (27 kDa) and the hybrid protein rDer p 2231 (25 kDa) were produced as described in Appendix S1. rDer p 2 and rDerp 23 have been kindly provided by the Department of Biosciences and Medical Biology, University of Salzburg, Salzburg, Austria and by the Department of Biochemistry of Chulalongkorn University, Thailand, respectively.

2.3 *D. pteronyssinus* extract (DpE)

Commercially available mites (Stallergenes Greer Ltd, London, United Kingdom) and 5 g of *D. pteronyssinus* (DpE) were used to generate the extract, according to the protocol previously described.²² The whole procedure is described in Appendix S2.

2.4 Donors and sera

Venous blood of non-atopic (n=30) and atopic (n=12) individuals was collected in heparin tubes and the plasma samples were evaluated for the presence of specific IgE (sIgE) to *D. pteronyssinus* (Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) to confirm atopy and their positive clinical history. Additionally, positivity in the skin prick test (SPT) for the *D. pteronyssinus* extract was also used as an inclusion criterion to atopy. Non-atopic donors reported no clinical symptoms of allergy and were presented with negative reaction to SPT, besides lack of sIgE. Table S1 details the reactivity profiles of the donors included in the study. The study was approved by the Ethics Committee on Research of the Faculty of Medicine of the Federal University of Bahia, (CAAE 45376814.0.0000.5577).

2.5 Reactivity of Human IgE

The reactivity of human IgE to rDer p 223, rDerp 1, rDerp 2 and Der p 23 allergens was obtained by indirect ELISA. Appendix S1 describes the experiment.

2.6 Culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for the determination of cytokine by MILLIPLEX MAP magnetic bead panel

Secreted cytokines and rDer p 2231 protein-induced reactivity profile were evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Peripheral blood from atopic (N=6) and non-atopic (N=6) patients was used to obtain PBMC.²³ Cells were stimulated for 120 hours with 20 µg/mL of DpE, 12.5 µg/mL of rDer p 2231; 10 µg/mL of pokeweed mitogen (PWM) was used as positive control.²³⁻²⁷ Supernatants were used to quantify a total of 18 cytokines, which were detected simultaneously using a multiplex human cytokine/chemokine magnetic bead panel (*MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* - Immunology Multiplex Assay, Millipore, Burlington, MA, USA), following the manufacturer's instructions. Mean fluorescent intensities were determined on a MAGPIX® System and serum concentration was calculated according to the standard curve and analyzed using MILLIPLEX® Analyst 5.1 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Appendix S1 describes the experiment.

2.8 *In vivo* immunotreatment using a murine model of allergy

A previously described murine model,^{23,28-31} with some modifications, was used to verify the potential of rDer p 2231 to attenuate airway inflammation. On days 0 and 7 A/J, mice (n=6) were sensitized by two subcutaneous injections of DpE (100 µg) adsorbed to 4 mg/mL Al(OH)₃ and diluted in phosphate-buffered saline (PBS). On days 14, 15, 16, 18, 20, 22 and 24, the challenge was applied by intranasal instillations of DpE (10 µg in 50 µL of PBS). During sensitization, the negative control group received PBS plus Al(OH)₃, whereas during challenges only PBS was applied. The treatments were performed daily from the 18th to the 24th day of the murine model. The experimental groups are detailed in Table 1. A day after the last challenge/treatment, the animals were euthanized; serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were collected for measurements of IgG1, IgG2a, IgE antibody responses and the production of blocking antibodies by indirect ELISA. Eosinophilic peroxidase (EPO) activity was measured by a colorimetric assay.^{28,29} Spleens were collected and processed.^{23,30} The production of cytokines IL-4, IL-5, IFN-γ and IL-10 was quantified in splenocyte culture supernatants, BALF and lung tissue by standard ELISA as recommended by the manufacturer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). All these procedures are detailed in Appendix S1.

3. RESULTS

3.1 Construction, expression and purification of the hybrid proteins

The rDer p 2231 hybrid protein consists of a sequence of 183 amino acid residues. In order to construct the hybrid protein, two types of ligands were used (Figure 1A). The tertiary structure presented 100% of residues modeled in a three-dimensional format, with three functional domains, p, uGDT and GDT values of 1.34×10^{-5} , 126 and 69 respectively. Therefore, based on these results, our model is of good quality. The modeled structure consists of 11% alpha helices, 32% beta-sheet and 55% spirals. The expression profile of the hybrid protein rDer p 2231, as well as the chromatograms obtained in the purification, is shown Figure 1B-D and the protein rDer p 1 is shown in Figure S1A. Both proteins were obtained in the insoluble fraction and migrated with a molecular weight (MW) of 25 and 27 kDa, respectively.

3.2 rDer p 2231 has lower IgE reactivity than parental allergens and allergen extract in *D. pteronyssinus* reactive sera

We tested with ELISA the IgE reactivity of rDer p 2231, DpE (extract), rDer p 1, rDer p 2 and rDer p 23 in the plasma from atopic individuals with allergic rhinitis and asthma (Table S1). Out of 30 samples, 50% displayed sIgE against rDer p 1, 63% for rDer p 2 and 67% for rDer p 23. Figure S1B shows the overall IgE reactivity with the cut-off line for each parent allergen. The frequency of triple sensitization to rDer p 1, rDer p 2 and rDer p 23 allergens was 13%. Double sensitization was observed with up to 27%, 23%, and 43% between rDer p 1 and rDer p 2, between rDer p 1 and rDer p 23, and rDer p 2 and rDer p 23, respectively. The hypoallergen rDer p 2231, on the other hand, showed an IgE reactivity profile of 36%. Although rDer p 2231 had an IgE percentage of 36%, a percentage reduction was observed in relation to rDer p 1, rDer p 2 and rDer p 23 of 67%, 88% and 79%, respectively (Figure 1E). The data from figure 1E was used to generate figures 1F-H.

3.3 PBMCs from atopic individuals stimulated with rDer p 2231 showed high levels of regulatory and Th1 cytokines

PBMC supernatants from atopic subjects stimulated or unstimulated with DpE were compared showing a reduction in baseline levels of IFN- γ (Figure 2A), an increase in basal levels of IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α , GM-CSF and a trend of increasing levels of IL-13, IL-1 α , IL-1 β and IL-1ra (Figure 2B).

Figure 2 also shows the baseline values of cytokines present in PBMC supernatants from atopic individuals stimulated or not with rDer p 2231, showing a reduction in baseline levels of IL-4, IL-5 and IL-13 (Figure 2B), an increase in the baseline values of IL-2, IL-15, IFN- γ cytokines and an expressive increase in IL-10, although not statistically significant (Figure 2A).

When the baseline values of cytokines present in the supernatants of non-stimulated cells of PBMC from atopic and non-atopic individuals were compared, a significant increase in IL-2, IL-13 and IL-1RA was observed, as well as a slight increase in IFN- γ and a significant reduction in IL-1 α and IL-1 β (Figure 2A-B.) The cytokines not mentioned in these comparisons showed no statistical differences.

Upon rDer p 2231 stimulation, a significant increase in the levels of IL-2, IL-10, IL-15, IFN- γ (Figure 2A) and a reduction in the levels of IL-1 β (Figure 2A) was observed in PBMC of atopic subjects in comparison with those of healthy donors. Figure 2B also shows a reduction in TNF- α and GM-CSF levels in PBMCs stimulated with rDer p 223.1

3.4 Treatment with rDer p 2231 reduced IgE production in mice allergic to *D. pteronyssinus*

In order to investigate the efficacy of rDer p 2231 as a therapeutic hypoallergen, we followed the schedule depicted in Figure 3A, which details our acute asthma model. Antibody responses in sera (Figure 3B-F), BALF and lung tissues (Figure S2A-J) of mice show significantly increased DpE-sIgE in Sham group compared to the Control group. The rDer p 2231 group, when compared with the Sham group, showed a tendency to reduce DpE-sIgE and rDer p 1-sIgE and cause a significant reduction for rDer p 2-sIgE and rDer p 23-sIgE (Figure 3B-F).

Unlike the IgE responses, sIgG1s were significantly produced after treatment with rDer p 2231 and Dexamethasone when compared to the Control group (Figure 3B-F). As for sIgG2a, a trend towards increased levels was noted for rDer p 1-sIgG2a, rDer p 23-sIgG2a and rDer p 2231-sIgG2a when compared with Control and Sham groups (Figures 3C, D, F). rDer p 2231 group displayed a trend of increased serum levels of rDer p 1-sIgG2a and rDer p 2231-sIgG2a compared to the Dexa group (Figures 3C, D). The animals treated with rDer p 2231 had serum levels of rDer p 2-sIgG1, rDer p 23-sIgG1, DpE-sIgG2a, rDer p 2231-sIgG2a and rDer p 23-sIgG2a significantly increased when related to the Sham group (Figure 3D-F). In an inhibitory assay, it was possible to observe that the serum of mice treated with rDer p 2231 significantly reduced the IgE binding capacity of rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 and DpE to reactive human sera (Figure 3G). This outcome suggests that rDer p 2231 can generate blocking antibodies against these antigens.

3.5 In the lungs, rDer p 2231 induces proliferation of lymphocytes and a decrease in the eosinophil numbers.

As shown in Figure 4, treatment with rDer p 2231 led to the downregulation of inflammatory immune cells as well as eosinophil peroxidase activity. In BALF total cell counts, an increase in the number of these cells was observed among mice in the Sham group compared to animals in the Control group (Figure 4A). Mice either treated with rDer p 2231 or

Dexamethasone have shown a significant decrease in the total number of these cells compared to animals in the Sham group. We also explored the distribution of the number of leukocytes in the BALF (Figure 4B); we observed that the ratio analysis for the differential counting revealed that the treatment with rDer p 2231 was associated with a significantly higher number of lymphocytes over the low number of eosinophils, whereas the Dexamethasone treatment was associated with lymphocytes and macrophages (Figure 4C). The eosinophil findings corroborate the profile of Eosinophilic Peroxidase (EPO) activity measured in the BALF and Lung (Figure 4D). Notably, sensitizations and challenges in mice with DpE produced a significant increase in EPO activity in BALF and in lung homogenates in animals in the Sham group when compared to the Control group. Treatment with rDer p 2231 significantly decreased EPO activity, as did the animals in the Dexamethasone-treated group, compared to the Sham group.

3.6 rDer p 2231 reduced the expression of Th2 profile cytokines and induced high levels of IL-10 and IFN- γ

Mice treated with rDer p 2231, when compared with the Sham treatment group, significantly reduced IL-4 and IL-5 levels in lung tissue and BALF (Figure 5A, B). Splenocytes from mice were stimulated with DpE, rDer p 2231, their parental allergens, LPS and/or PHA. These stimuli were initially compared with non-stimulated cells, with the results showed in the Figure 5C-F. In this figure one can observe that the treatment with rDer p 2231 was more effective than Dexamethasone regarding the reduction of IL-4, given the significantly lower secretion in non-stimulated cells and when DpE and rDer p2231 were used as stimuli. In contrast, IL-10 showed an increase in its baseline values compared to all the other mice groups, and when splenocytes were stimulated with rDer p 23, DpE and rDer p 2231. Very similar significant results were found for IFN- γ (DpE and rDer p2231 stimuli), although the increased baseline levels were not significant (Figure 5C-F).

DISCUSSION

The hypoallergenic hybrid molecule rDer p 2231 based on T-cell epitopes was successfully expressed and purified. The hybrid molecule displayed an IgE reactivity of 36%, with a percentage of reduction observed in relation to the parental molecules rDer p 1, rDer p 2 and rDer p 23 suggesting a reduced risk of rDer p 2231 in inducing IgE-mediated side effects. The frequency of sensitization to the main *D. pteronyssinus* allergens in the present study was similar to previous reports from Thailand, USA and Europe.^{17,18,32-34}

It has been shown that the Der p 23 allergen is as important as Der p 1 and Der p 2 in the process of allergic sensitization in individuals sensitized to *D. pteronyssinus* in the population of Salvador.³⁵ These data corroborate our findings, where comparable levels of IgE reactivity

to Der p 23 and Der p 2 were shown, with Der p 23 being slightly more frequent than Der p 2 and Der p 1. Studies showed that the variability of allergen IgE reactivity may be associated with factors such as geographic region, age and clinical manifestations of allergy.^{17,18,32-34}

PBMC cultures from atopic individuals revealed that stimulation with rDer p 2231 induced higher levels of IL-2, IL-10, IL-15 and IFN- γ than *D. pteronyssinus* extract, and lower levels of IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α and GM-CSF. These results allow us to speculate that rDer p 2231 induces an immune response different from the classical allergic Th2 response, which predicts the efficacy for the treatment of allergy.³⁶ By inducing high levels of IL-10, a cytokine with anti-inflammatory and regulatory functions, rDer p 2231 appears to stimulate T-cell proliferation. IL-10 derived from TH cells is an important mediator in the success of AIT, as these cells play a crucial role in the regulation of allergic responses.^{23,37-39} IL-2 showed high levels in PBMCs stimulated with rDer p 2231, corroborating previous studies where AIT increased IL-2 in asthmatic individuals.⁴⁰⁻⁴² It is known that IL-2 produced in the nasal mucosa may act in combination with IL-10 to cause immune shift from Th2 / Th0 to Th0 / Th1.⁴³ Another cytokine found in high levels in this study was IL-15. Asthmatic patients who used glucocorticosteroids had elevated IL-15 in both sputum and cultured sputum leukocytes.⁴⁴ That indicates a possible immunomodulating function of IL-15, involving the induction of alterations from Th2 to Th1.⁴⁵ In part, the high levels of IFN- γ in PBMCs stimulated with rDer p 2231 also influence the change in the response profile. This change may inhibit airway remodeling induced by Th2 responses.⁴⁵

Furthermore, the reduction in sIgE levels can be explained by the downregulation that rDer p 2231 was able to induce in the production of cytokines IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α and GM-CSF in PBMCs. Allergen-activated Th2 cells secrete IL-4, IL-5 and IL-13, whose main biological functions are the production of IgE, recruitment of eosinophils to the local inflammatory site and production of mucus in the airway epithelium, respectively.^{1,46,47}

Our data also show a reduction in TNF- α and GM-CSF levels in PBMCs stimulated with rDer p 2231. Studies show that, in both humans and mice, the increase in these cytokines is involved in a worsening of the therapeutic response, and an exacerbation of asthma.⁴⁸⁻⁵¹ In this study, we also evaluated the profile of cytokines IL-1 α , IL-1 β and IL-1RA. Among PBMCs from non-atopic individuals, it was observed that the IL-1 β expression was increased, and no data were found in the literature that correlate with an increase in IL-1 β in non-atopic individuals. Studies have revealed that specifically IL-1 α and IL-1 β can instruct lung dendritic cells to induce Th2 responses.⁵²⁻⁵⁴ Among PBMCs from atopic individuals stimulated with rDer p 2231, we noticed a trend towards increased expression of IL-1RA, which seems to regulate the expression of IL-1 β . Previous studies have shown that IL-1RA regulates IL-1 signaling, competing with IL-1 α and IL-1 β for IL-1RI binding, thus preventing the formation of a receptor

signaling complex mediated by IL-1 α and IL-1 β . An additional study showed that elevated serum levels of IL-1RA correlate with a lower risk of worsening asthma control.⁵⁵

In our *in vivo* study, we showed the hypoallergenic potential of rDer p 2231 in the treatment of pulmonary inflammation induced by the model of asthma is DpE extract. Mice treated with rDer p 2231 showed reduced IgE to the extract and to parental allergens in serum, BALF and lung. Although there are no statistical differences in IgG1 and IgG2a antibody titers between the animals in the treatment groups, an increase in these titers compared to the untreated group in serum samples was observed. Additionally, there was an increase in these antibodies in the animals treated with rDer p 2231 compared to the Sham group, Dexamethasone and the untreated group in the BALF and lung samples. Previous studies with *D. pteronyssinus*-derived hypoallergens reported induction of high titers of IgG antibodies and regulation of IgE to lower levels after immunization.^{37,56,57} Our findings were similar to this, because the T-cell epitopes of the allergens Der p 1, Der p 2 and Der p 23 were used to construct the rDer p 2231 molecule, which was capable of inducing an adaptive immune response in mice with the production of IgG antibodies and low production of IgE. Treatment with rDer p 2231 changed the total cells in BALF, as well as the number of eosinophils and neutrophils and an increase in the number of lymphocytes and macrophages. The reduction in neutrophil and eosinophil secretion was previously associated with an improvement in allergies and the increase is often correlated with the severity and exacerbation of the disease.⁵⁸ A downregulation in EPO activity in BALF and lung tissue has also been observed in mice treated with rDer p 2231. These effects are likely associated with a decreased Th2 response, as EPO, the most abundant cationic protein in toxic granules, which is used as a specific marker of eosinophils and is related to the release of cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13.⁵⁸

Reduced levels of Th2 profile cytokines were observed in lung tissue, BALF and splenocytes, followed by increased levels of IL-10 and IFN- γ in splenocytes from rDer p 2231 treated mice. These data corroborate PBMC cytokine results, whose ratio results indicate that the decrease observed in Th2 cytokines can be mediated by IL-10 and IFN- γ . However, these data do not make it clear which of these two cytokines has more influence on the downregulation of IL-4 and IL-5 in this model presented. Nevertheless, our findings indicate that rDer p 2231 can potentially induce a regulatory and/or Th1 biased immune response. This response profile has already been described in other studies.^{10,23,59} Finally, our results indicate that the hybrid molecule rDer p 2231 has displayed potential to be used as a multicomponent vaccine with the potential to treat *D. pteronyssinus* sensitized individuals. Future studies using rDer p 2231 in a chronic mouse model of allergy will demonstrate the long-term benefits of its hypoallergenic and immunogenic characteristics.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the support of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq, grant 403336/2021-0) as well as the Research Foundation of the State of Bahia (Fapesb), grant BOL0320/2018 and 164990/2020-8. ESS is currently supported by a post-doctoral fellowship from CNPq (grant 164990/2020-8). We also thank teacher Abilio Borghi for the assistance with the English language review.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CSP designed the study and supervised the project. NMAN and ESS were involved in the conception and co-supervision of the project. AMSF significantly contributed to perform the present study, wrote the manuscript and conducted the laboratory assays. EFS, EMMAB, LFS, RCS, VSA and DMC actively participated in animal experiments, helped with laboratory assays and revised the manuscript. CSP, NMAN, ESS, FF, AJ and LGCP analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(6):1485-1498.
2. Durham SR, Emminger W, Kapp A, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3):717-725 e715.
3. Pellaton C, Perrin Y, Boudousquie C, et al. Novel birch pollen specific immunotherapy formulation based on contiguous overlapping peptides. *Clin Transl Allergy*. 2013;3(1):17.
4. Prickett SR, Rolland JM, O'Hehir RE. Immunoregulatory T cell epitope peptides: the new frontier in allergy therapy. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(6):1015-1026.
5. Huang HJ, Curin M, Banerjee S, et al. A hypoallergenic peptide mix containing T cell epitopes of the clinically relevant house dust mite allergens. *Allergy*. 2019;74(12):2461-2478.
6. Couroux P, Patel D, Armstrong K, Larche M, Hafner RP. Fel d 1-derived synthetic peptide immuno-regulatory epitopes show a long-term treatment effect in cat allergic subjects. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(5):974-981.
7. Gupta K, Kumar S, Das M, Dwivedi PD. Peptide based immunotherapy: a pivotal tool for allergy treatment. *Int Immunopharmacol*. 2014;19(2):391-398.
8. Silva ESD, Pinheiro CS, Pacheco LGC, Alcantara-Neves NM. Dermatophagoides spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? *Expert Opin Ther Pat*. 2020;30(3):163-177.
9. Zhao BB, Diao JD, Liu ZM, Li CP, Jiang YX. Generation of a chimeric dust mite hypoallergen using DNA shuffling for application in allergen-specific immunotherapy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(7):3608-3619.

10. Martinez D, Cantillo JF, Herazo H, et al. Characterization of a hybrid protein designed with segments of allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Immunol Lett*. 2018;196:103-112.
11. Chen KW, Blatt K, Thomas WR, et al. Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(2):435-443 e434.
12. Asturias JA, Ibarrola I, Arilla MC, et al. Engineering of major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2 for allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(7):1088-1098.
13. Prickett SR, Voskamp AL, Dacumos-Hill A, Symons K, Rolland JM, O'Hehir RE. Ara h 2 peptides containing dominant CD4+ T-cell epitopes: candidates for a peanut allergy therapeutic. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):608-615 e601-605.
14. Portnoy J, Miller JD, Williams PB, et al. Environmental assessment and exposure control of dust mites: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;111(6):465-507.
15. da Silva DR, Binotti RS, da Silva CM, de Oliveira CH, Condino-Neto A, de Capitani EM. Mites in dust samples from mattress surfaces from single beds or cribs in the south Brazilian city of Londrina. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16(2):132-136.
16. Caraballo L, Valenta R, Puerta L, et al. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. *World Allergy Organ J*. 2020;13(5):100118.
17. Posa D, Perna S, Resch Y, et al. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(2):541-549 e548.
18. Kowal K, Pampuch A, Siergiejkó G, et al. Sensitization to major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens in house dust mite allergic patients from North Eastern Poland developing rhinitis or asthma. *Adv Med Sci*. 2020;65(2):304-309.
19. Hinz D, Oseroff C, Pham J, Sidney J, Peters B, Sette A. Definition of a pool of epitopes that recapitulates the T cell reactivity against major house dust mite allergens. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(10):1601-1612.
20. Kalita P, Lyngdoh DL, Padhi AK, Shukla H, Tripathi T. Development of multi-epitope driven subunit vaccine against *Fasciola gigantica* using immunoinformatics approach. *Int J Biol Macromol*. 2019;138:224-233.
21. Kallberg M, Margaryan G, Wang S, Ma J, Xu J. RaptorX server: a resource for template-based protein structure modeling. *Methods Mol Biol*. 2014;1137:17-27.
22. Santos da Silva E, Marques Ponte JC, Barbosa da Silva M, et al. Proteomic Analysis Reveals Allergen Variability among Breeds of the Dust Mite *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;180(3):159-172.
23. da Silva ES, Aglas L, Pinheiro CS, et al. A hybrid of two major *Blomia tropicalis* allergens as an allergy vaccine candidate. *Clin Exp Allergy*. 2020;50(7):835-847.
24. Barreto ML, Cunha SS, Alcantara-Neves N, et al. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). *BMC Pulm Med*. 2006;6:15.
25. Figueiredo CA, Amorim LD, Alcantara-Neves NM, et al. Environmental conditions, immunologic phenotypes, atopy, and asthma: new evidence of how the hygiene hypothesis operates in Latin America. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1064-1068 e1061.
26. Santos LN, Gallo MB, Silva ES, et al. A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects. *Parasite Immunol*. 2013;35(5-6):188-193.
27. Moreno Amor AL, Santos LN, Alcantara Galvao A, et al. Candidin and trichophytin stimulate the production of Th1 and regulatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells: implication for their use as adjuvants in immunotherapy. *Immunotherapy*. 2014;6(12):1255-1264.

28. Santos Serafim Machado M, Ferreira Silva HB, Rios R, et al. The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kappab) activation. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:168.
29. Oliveira TT, Campos KM, Cerqueira-Lima AT, et al. Potential therapeutic effect of *Allium cepa* L. and quercetin in a murine model of *Blomia tropicalis* induced asthma. *Daru*. 2015;23:18.
30. Costa RS, Carneiro TC, Cerqueira-Lima AT, et al. *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. *Int Immunopharmacol*. 2012;13(1):126-134.
31. Baqueiro T, Russo M, Silva VM, et al. Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. *Respir Res*. 2010;11:51.
32. Soh WT, Le Mignon M, Suratannon N, et al. The House Dust Mite Major Allergen Der p 23 Displays O-Glycan-Independent IgE Reactivities but No Chitin-Binding Activity. *Int Arch Allergy Immunol*. 2015;168(3):150-160.
33. Batard T, Baron-Bodo V, Martelet A, et al. Patterns of IgE sensitization in house dust mite-allergic patients: implications for allergen immunotherapy. *Allergy*. 2016;71(2):220-229.
34. Mueller GA, Randall TA, Glesner J, et al. Serological, genomic and structural analyses of the major mite allergen Der p 23. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(2):365-376.
35. Pinheiro CS, Silva ES, de Andrade Belitardo EMM, et al. En route to personalized medicine: uncovering distinct IgE reactivity pattern to house dust mite components in Brazilian and Austrian allergic patients. *Clin Transl Allergy*. 2021;11(1):e12004.
36. Schulke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol*. 2018;9:455.
37. Branchett WJ, Stolting H, Oliver RA, et al. A T cell-myeloid IL-10 axis regulates pathogenic IFN-gamma-dependent immunity in a mouse model of type 2-low asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(2):666-678 e669.
38. Wambre E. Effect of allergen-specific immunotherapy on CD4+ T cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015;15(6):581-587.
39. Boonpiyathad T, Sokolowska M, Morita H, et al. Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy. *Allergy*. 2019;74(5):976-985.
40. Zhang YZ, Luo J, Wang ZH, Wang J. Efficacy and safety of sublingual dust mite drops in children with mono- or polysensitized allergic rhinitis. *Am J Otolaryngol*. 2019;40(5):755-760.
41. De Amici M, Puggioni F, Casali L, Alesina R. Variations in serum levels of interleukin (IL)-1beta, IL-2, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha during specific immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;86(3):311-313.
42. Yin GQ, Jiang WH, Wu PQ, He CH, Chen RS, Deng L. Clinical evaluation of sublingual administration of dust mite drops in the treatment of allergic asthma and allergic rhinitis of children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(20):4348-4353.
43. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(6):1025-1034; quiz 1035.
44. Komai-Koma M, McKay A, Thomson L, et al. Immuno-regulatory cytokines in asthma: IL-15 and IL-13 in induced sputum. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(9):1441-1448.
45. Yan L, Xiao-Ling S, Zheng-Yan C, Guo-Ping L, Sen Z, Zhuang C. HSP70/CD80 DNA vaccine inhibits airway remodeling by regulating the transcription factors T-bet and GATA-3 in a murine model of chronic asthma. *Arch Med Sci*. 2013;9(5):906-915.
46. Eifan AO, Durham SR. Pathogenesis of rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(9):1139-1151.
47. Gould HJ, Ramadani F. IgE responses in mouse and man and the persistence of IgE memory. *Trends Immunol*. 2015;36(1):40-48.
48. Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, et al. Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax*. 2005;60(12):1012-1018.

49. Dejager L, Dendoncker K, Eggermont M, et al. Neutralizing TNFalpha restores glucocorticoid sensitivity in a mouse model of neutrophilic airway inflammation. *Mucosal Immunol.* 2015;8(6):1212-1225.
50. Nobs SP, Kayhan M, Kopf M. GM-CSF intrinsically controls eosinophil accumulation in the setting of allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(4):1513-1524 e1512.
51. Willart MA, Deswarte K, Pouliot P, et al. Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med.* 2012;209(8):1505-1517.
52. Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(17):7119-7124.
53. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):89-102.
54. Willart M, Hammad H. Lung dendritic cell-epithelial cell crosstalk in Th2 responses to allergens. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(6):772-777.
55. Akiki Z, Rava M, Diaz Gil O, et al. Serum cytokine profiles as predictors of asthma control in adults from the EGEA study. *Respir Med.* 2017;125:57-64.
56. Banerjee S, Weber M, Blatt K, et al. Conversion of Der p 23, a new major house dust mite allergen, into a hypoallergenic vaccine. *J Immunol.* 2014;192(10):4867-4875.
57. Mrkic I, Minic R, Popovic D, Zivkovic I, Gavrovic-Jankulovic M. Newly designed hemagglutinin-Der p 2 chimera is a potential candidate for allergen specific immunotherapy. *Life Sci.* 2018;213:158-165.
58. Choi Y, Jeon H, Yang EA, Yoon JS, Kim HH. Nasal eosinophilia and eosinophil peroxidase in children and adolescents with rhinitis. *Korean J Pediatr.* 2019;62(9):353-359.
59. Hofer H, Asam C, Hauser M, et al. Tackling Bet v 1 and associated food allergies with a single hybrid protein. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(2):525-533 e510.

Table 1. Distribution of *In vivo* model groups

Group Experimental	Sensitization (Subcutaneous)	Challenge (Intranasal instillations)	Treatment (Subcutaneous)
Control	PBS + Alum (4 mg/mL)	PBS	PBS
Sham	<i>D. pteronyssinus</i> (100 µg) + Alum (4 mg/mL) + PBS	<i>D. pteronyssinus</i> (10 µg) + PBS	PBS
DEXA	<i>D. pteronyssinus</i> (100 µg) + Alum (4 mg/mL) + PBS	<i>D. pteronyssinus</i> (10 µg) + PBS	Dexamethasone Disodium Phosphate received (1 mg / kg) diluted in PBS
rDer p 2231	<i>D. pteronyssinus</i> (100 µg) + Alum (4 mg/mL) + PBS	<i>D. pteronyssinus</i> (10 µg) + PBS	rDer p 2231 (25 µg) diluted in PBS

Figure Legends

Figure 01. Structural and *in vitro* characterization of rDer p 2231. **A:** Peptide sequence of the T-cell epitopes of the Der p 1, Der p 2 and Der p 23 allergens and of ligands. **B:** Expression and purification of rDer p 2231: Lane 1: before IPTG induction; Lane 2: after IPTG, 1 h induction; Lane 3: after IPTG, 6 h induction; Lane 4: soluble fraction of bacterial extract; Lane 5: solubilized-bacterial pellet; Lane 6: representative sample from affinity chromatography; Lane 7: representative sample from desalting. **C:** Chromatogram of rDer p 2231 protein purification using HisTrap FF Ni Sepharose. **D:** Chromatogram of HiTrap Desalting in Sephadex G-25 resin. **E:** Determination of IgE reactivity to DpE, rDer p2231 and parental allergens in plasma samples from non-atopic (n=30) and atopic (n=12) individuals. IgE activity comparisons between rDer p 2231 and Der p 1(**F**), Der p 2 (**G**), Der p 23 (**H**).

Figure 02. Cytokine concentrations in cultures of peripheral blood mononuclear cells from healthy (n=6) and allergic healthy (n=6) individuals stimulated with rDer p 2231, *D. pteronyssinus* extract (DpE), and the pokeweed mitogen (PWM). The Milliplex Map Human Cytokine kit was used to measure Eotaxin, GM-CSF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-13, IL-15, IL-17A, MIP-1 α and TNF- α . **A:** Treg and Th1 cytokines. **B:** Th2, Th17 and IL-1 family cytokines. The paired t-test was used to verify statistical differences, which are indicated by the symbols § (non-stimulated cells / stimulated cells from the atopic group) and # (non-stimulated cells / stimulated cells from the non-atopic group). After this analysis, for comparisons between groups with the same stimulus, the unpaired t test was used, indicated by the symbol *.§, #, *- P <0.05; §§, ##, ***- P <.01; §§§, ###, ****- P <0.0001 and §§§§, #### P <0.00001.

Figura 03. *In vivo* responses of the hypoallergenic hybrid rDer p 2231 in serum. **A:** Schematic representation of sensitization, challenge and treatment schedules in A/J mice (n=6). **B:** specific IgE, IgG1, IgG2a for DpE. **C:** specific IgG1, IgG2a and IgE for rDer p 2231. **D:** specific IgG1, IgG2a and IgE for rDer p 1. **E:** specific IgG1, IgG2a and IgE for rDer p 2. **F:** specific IgG1, IgG2a and IgE for rDer p 23. **G:** Human sIgE inhibition profile in animals treated with rDer p 2231. One-way ANOVA with Tukey's or Dunn's post tests were used to verify statistical differences. # Control comparisons, * Sham treatment comparisons, § Dexamethasone treatment comparisons. #, *, § -P <.05; ##, **, §§ -P <.01; ###, ***, §§§ -P <0.0001.

Figure 04. Effect of hypoallergenic hybrid rDer p 2231 on cellular inflammation and eosinophil peroxidase activity. Total (**A**) and differential (**B**) cell counts. **C:** Heat map

analysis of the inflammatory cell ratio. **D**: EPO activity in BALF and lungs in A/J mice (n=6). One-way ANOVA with Tukey's or Dunn's post tests were used to verify statistical differences. #Control comparisons, *Sham treatment comparisons, & Dexamethasone treatment comparisons. #, *, & -P <.05; ##, **, && -P <.01; ###, ***, &&& -P <0.0001.

Figure 05. Influence of hypoallergenic hybrid rDer p 2231 on cytokines levels from splenocytes, BALF and lung tissue of mice. Samples were analyzed by capture ELISA to measure IL-4, IL-5, IL-10, and IFN- γ in BALF (**A**) and lung tissue (**B**) in A/J mice (n=6). One-way ANOVA with Tukey's or Dunn's post tests was used to verify statistical differences. #Comparisons with Control group. *Comparisons with Sham treated group. §Comparisons with dexamethasone treatment group. #, *, § -P <.05; ##, **, §§ -P <.01; ###, ***, §§§ -P <.0001. Supernatants of splenocytes' cultures were collected for the measurements of IL-4(**C**), IL-5(**D**), IL-10(**E**), and IFN- γ (**F**).

Figure 01

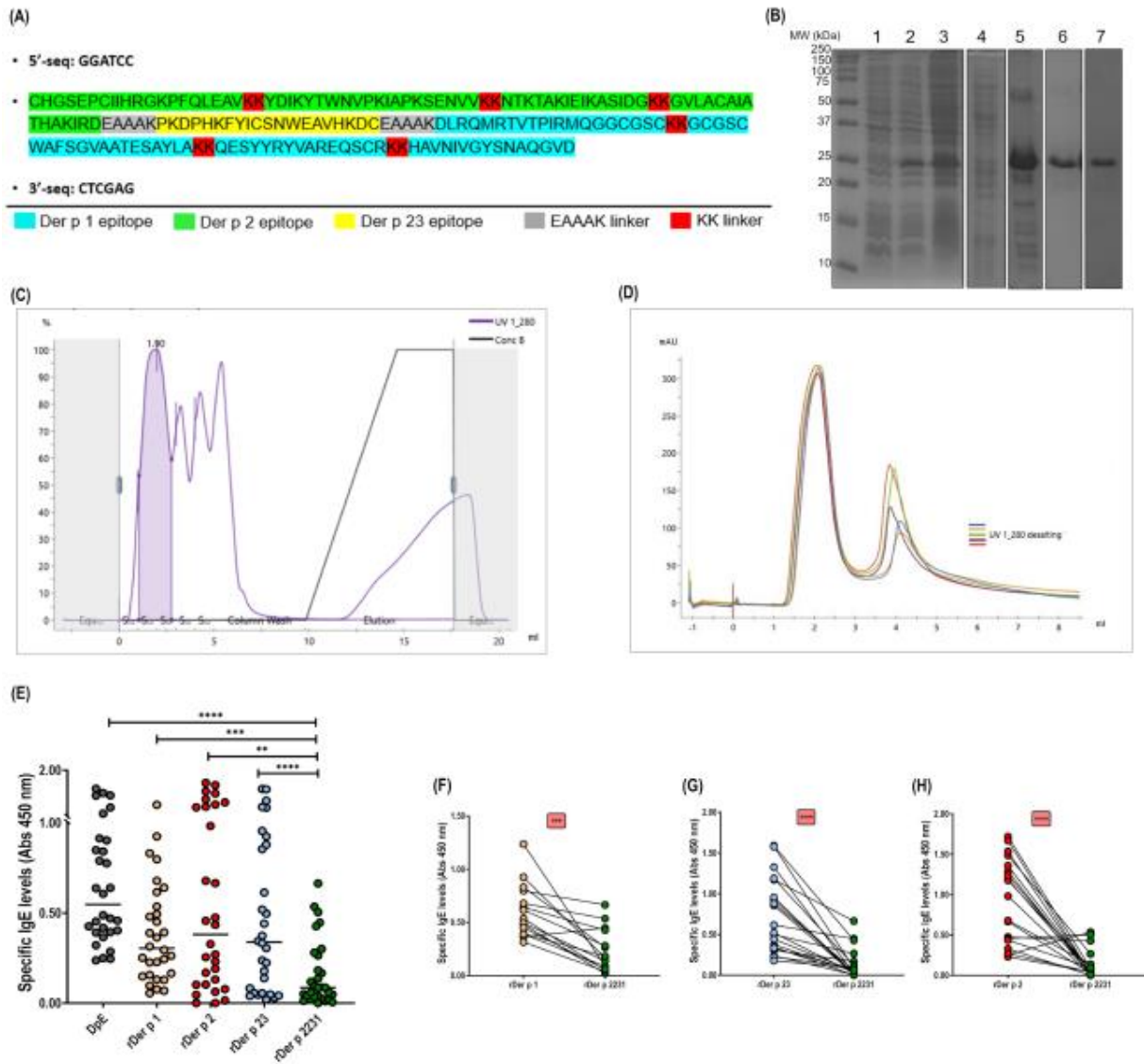


Figure 02

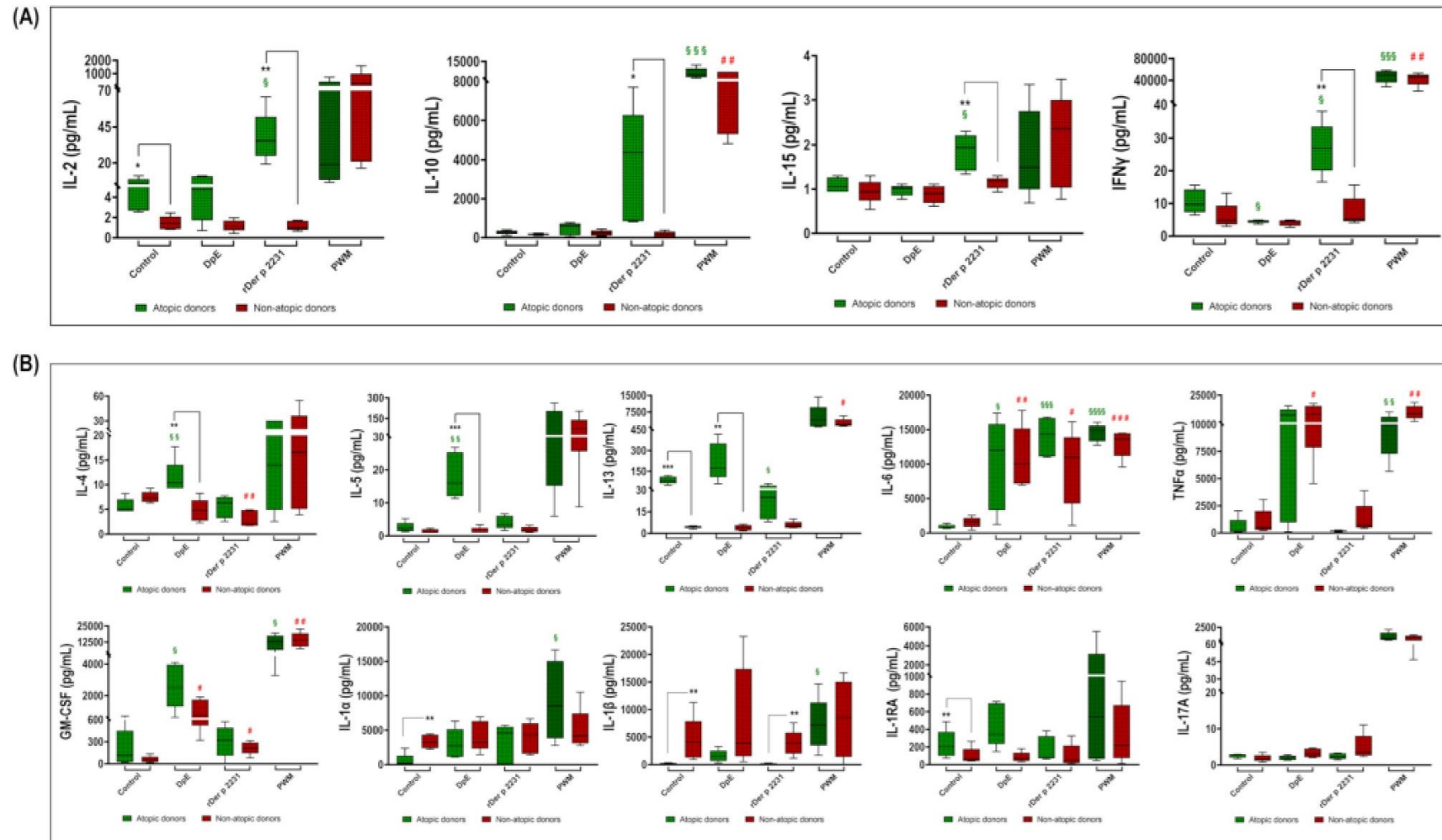


Figure 03

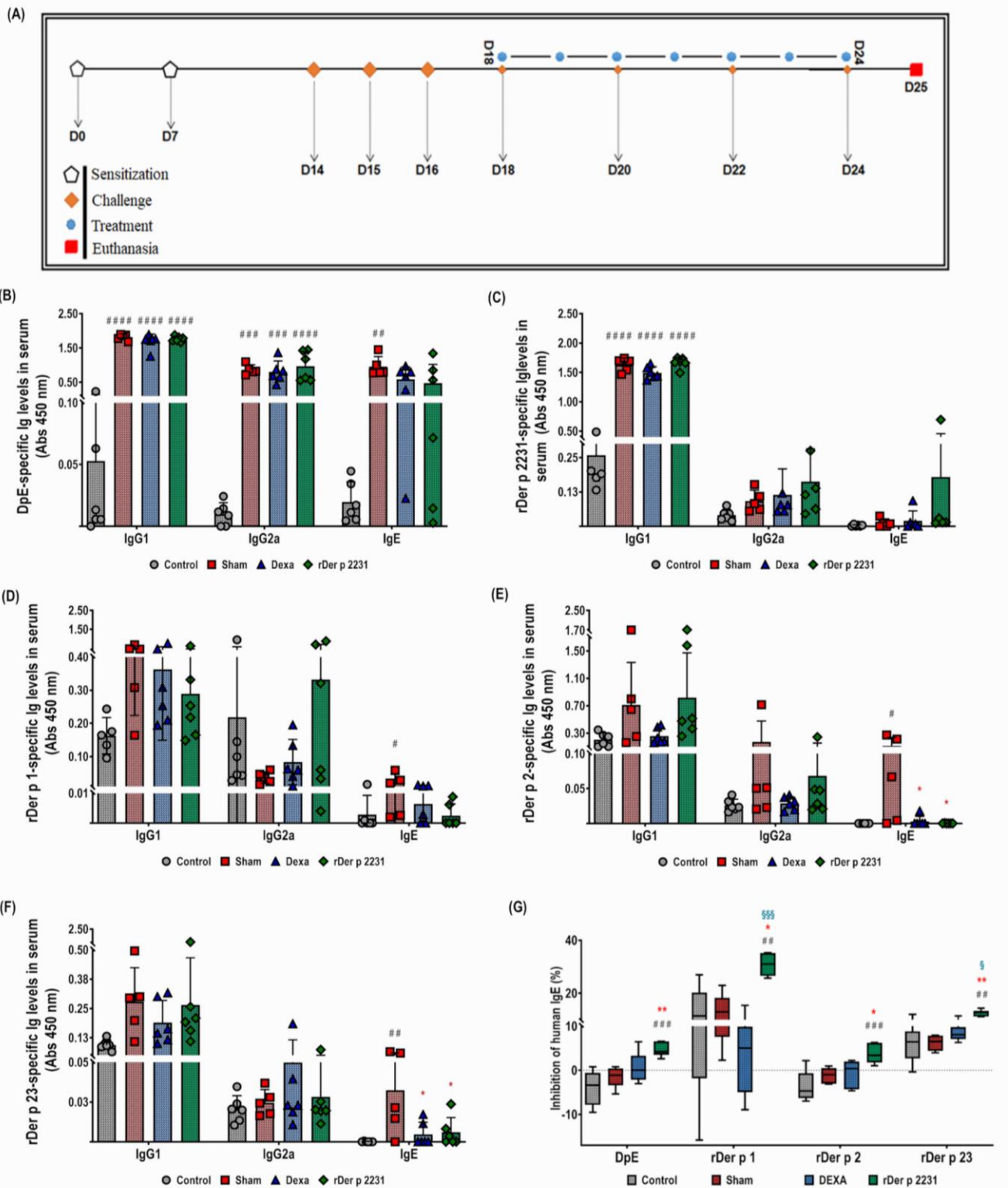
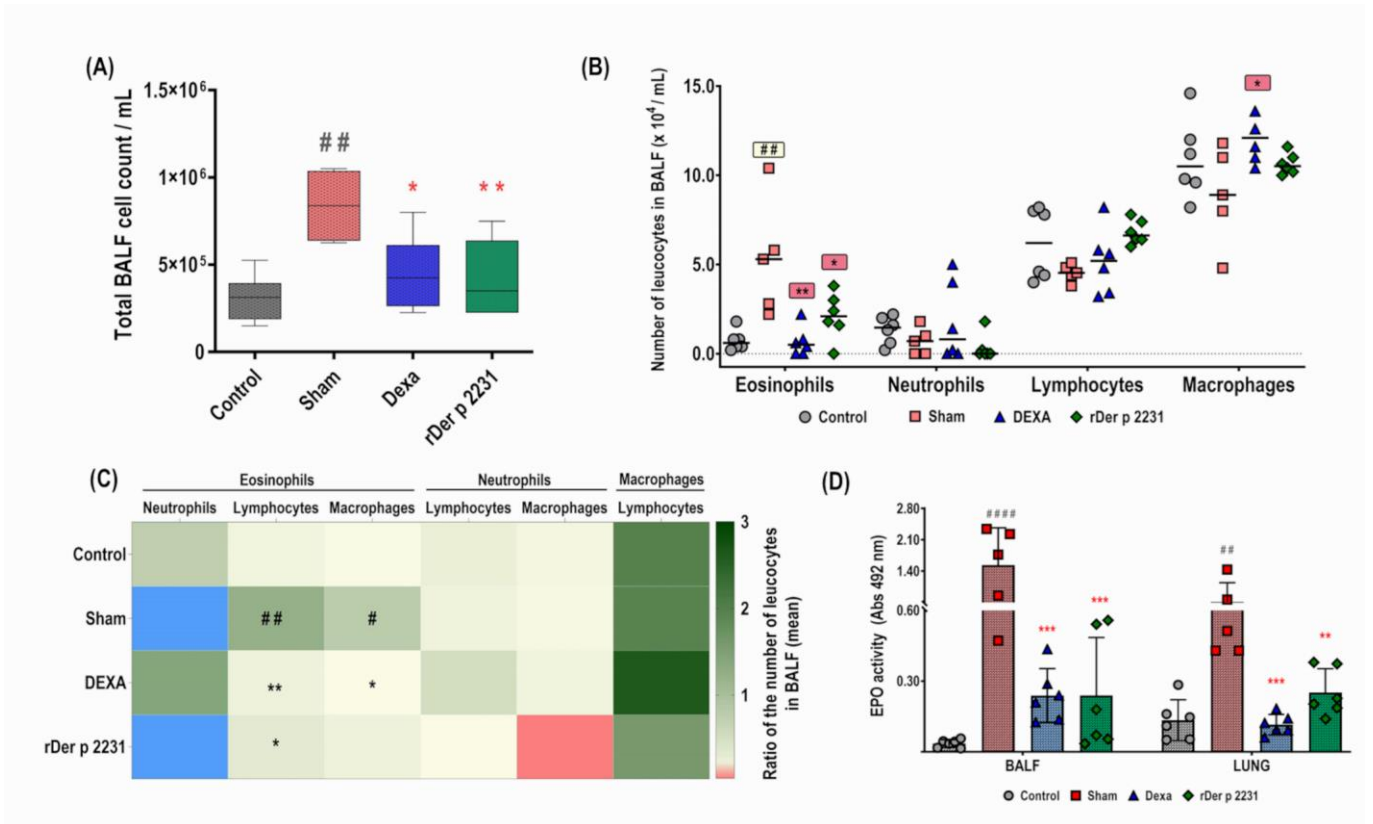


Figure 04



ONLINE SUPPORTING INFORMATION

Recombinant T-cell epitope conjugation: a new approach for Dermatophagoides hypoallergen design

Antônio Márcio Santana Fernandes^{1,2}, Eduardo Santos da Silva¹, Elisânia Fontes Silveira¹, Emília Maria Medeiros de Andrade Belitardo¹, Leonardo Freire Santiago¹, Raphael Chagas Silva¹, Vitor dos Santos Alves¹, Deise Malta Carneiro¹, Fatima Ferreira³, Alain Jacquet⁴, Luis Gustavo Carvalho Pacheco^{1,2}, Neuza Maria Alcantara-Neves^{1,2}, Carina Silva Pinheiro^{1,2*}

METHODS

Construction of hypoallergenic chimeric proteins

Six hypoallergenic proteins were designed using dominant sequences from antigenic regions of T-cell epitopes of the Der p 1, Der p 2 and Der p 23 allergens. The sequences were selected from a published work, in which the authors defined 137 specific immunodominant T-cell epitopes for the *D. pteronyssinus* mite.¹ For the construction of candidate proteins, EAAAK ligands were used to separate the peptides between the different allergens and KK ligands were used to bind peptides.² The design of the six hybrid molecules were generated by modifying the position of the peptides of the allergens. The constructs were termed rDer p 2321, rDer p 2123, rDer p 1232, rDer p 2231, rDer p 2312 and rDer p 1223. The immunogenicity of the generated hybrids was confirmed by prediction of MHC-II binding using the IEDB analysis resource Consensus tool (<https://www.iedb.org/>). The tertiary structures of the different arrays were modeled using the RaptorX server (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/prever/>).³ The best rDer p 2231 model was chosen based on the number of functional domains, P-value and uGDT (GDT).

Heterologous expression and purification

All the protein coding sequences in the present work were codon-harmonized for optimal expression in *Escherichia coli*. The expression vectors for rDer p 2231 and rDer p 1 containing the harmonized sequences were transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and BL21 (DE3) (Novagen, Madison, WI), respectively. One colony was selected for protein expression, which was performed in Luria Bertani (LB) medium and the induction of expression was performed through the addition of 1 mM Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) when OD600 reached 0.6 nm. The expression of recombinant proteins occurred for 6h, 200 rpm rotation and temperatures 26°C for rDer p 2231 and 37°C for rDer p 1. Then, the bacterial pellet of the cultures was obtained by centrifugation at 4,000

g, 20 minutes, 4 °C and resuspended in 50 mM NaP (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄), pH 7.4. Seven 15-second sonication cycles were used to lyse the bacteria in a Q55-110 Qsonica® sonicator (Newtown, CT, USA), and the experiment was performed in an ice bath. The samples were then centrifuged at 13,000 g for 20 min, at 4 °C and the supernatant was collected. The lysate pellet was resuspended in 6M urea. The expression and solubility of the recombinant antigens were evaluated using 12% SDS-PAGE. The purification of recombinant proteins was performed by automated affinity chromatography (rDer p 2231), using a HisTrap FF Ni Sepharose, and HiTrap Desalting columns with Sephadex G-25 resin for fast and convenient desalting and buffer exchange. The size exclusion chromatography (rDer p 1) with a Superdex TM 75 increase 10/300 GL column (GE healthcare) in AKTA pure equipment (GE healthcare). Fractions of 1mL were collected, and the material analysis was performed using a 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. rDer p 2 and rDerp 23 have been kindly provided by the Department of Molecular Biology, University of Salzburg, Austria, and by the Department of Biochemistry Chulalongkorn University, Thailand, respectively.

***D. pteronyssinus* extract (DpE)**

Commercially available mites (Stallergenes Greer Ltd, London, United Kingdom) and 5 g of *D. pteronyssinus* (DpE) were used to generate the extract, according to the protocol previously described.⁴ The Bradford method was used to determine the protein content of the extract, which was standardized by determining the Der p 1 allergen concentration using an ELISA kit (INDOOR Biotechnologies, Charlottesville, VI, USA). The concentration of Der p 1 was 15.12 ng ng per µg of protein in DpE. The somatic extract was stored at -20 °C until use.

Reactivity of Human IgE

In brief, ELISA plates were coated with with 100 µg/ml of DpE and 5 µg/ml of each recombinant protein in a sodium carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4°C. After a 12-hour blocking (4 °C) with PBS-T containing 10% fetal calf serum (FCS, Gibco, Pislely, UK), plasma of atopic patients was added (1:5), which was incubated overnight (ON). After washing, specific IgE (sIgE) was detected with a biotinylated anti-human IgE antibody (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) incubated for 1 h, followed by the addition of HRP-streptavidin. The reaction was developed using 3.3', 5.5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate.

Stimulation of peripheral blood mononuclear cells with hybrid proteins and their parental allergens

Blood donors were selected to obtain PBMCs following the same criteria as in item 2.4, associated with the gold standard diagnostic tools. We also used an *in vitro* multiplex allergen assay recently developed by our group.⁵ This item also contains the informed consent form

used in this trial. Peripheral blood from atopic patients (N=6) and non-atopic patients (N=6) (Table S2) was obtained under sterile conditions and disposed in tubes containing sodium heparin (0.1 mg/mL). Whole blood was diluted 1:1 in a sterile 0.9% sodium chloride solution. Cells were isolated by gradient centrifugation with Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Illinois, USA) at a ratio of 4:1 v/v. After centrifugation, the cells placed in the separation cloud were collected, thus yielding the PBMC. Cells were washed two times with RPMI 1640 medium, counted and resuspended in RPMI 1640 medium (GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine (v/v), 100 µl/ml gentamicin, enriched with 10% FCS (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were incubated in 96-well plates (2×10^5 cells/well) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C, and restimulated with 20 µg/mL DpE, 12.5 µg/mL rDer p 2231. The 10 µg/mL pokeweed mitogen (PWM) was used as a positive control.⁶⁻¹⁰ Polymyxin B (20 µg/ mL) was used to block lipopolysaccharide (LPS)-related cytokine production. Cultures were performed 120 h and supernatants were collected after this time and stored at -20°C for further quantification of cytokine concentrations.

Determination of cytokines by MILLIPLEX MAP Magnetic Bead Panel

Secreted cytokines and rDer p 2231 protein-induced reactivity profile were evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Following the same criteria as in item 2.4, associated with the gold standard diagnostic tools, we also used an *in vitro* multiplex allergen assay recently developed by our group.⁵ The method allows simultaneous measurement of sIgE against the entire allergen extract as well as its components. Table S2 details the reactivity profile of the donors included in the study. Peripheral blood from atopic (N=6) and non-atopic (N=6) patients was used to obtain PBMC.⁶ Cells were stimulated for 120 hours with 20 µg/mL of DpE, 12.5 µg/mL of rDer p 2231; 10 µg/mL of pokeweed mitogen (PWM) was used as positive control.⁶⁻¹⁰ Supernatants were used to assay a total of 18 cytokines, which were detected simultaneously using a multiplex human cytokine/chemokine magnetic bead panel (*MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* - Immunology Multiplex Assay, Millipore, Burlington, MA, USA), following the manufacturer's instructions. Cytokines/chemokine for which we measured concentration levels at 120h were as follows: eotaxin, granulocyte and macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interferon-α2 (IFN-α2), IFN-γ, interleukin-1α (IL-1α), IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-13, IL-15, IL-17A, macrophage-1α inflammatory protein (MIP-1α), tumor necrosis factor-α (TNF-α). Mean fluorescent intensities were determined on a MAGPIX® System and serum concentration was calculated according to the standard curve and analyzed using MILLIPLEX® Analyst 5.1 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

***In vivo* treatment-murine model**

A previously described murine model,^{6,11-14} with some modifications, was used to verify the potential of rDer p 2231 to attenuate airway inflammation. The amount of LPS in the recombinant protein and allergenic extract samples was quantified by the end-point chromogenic LAL assay (QCL-1000 kit; Lonza, Walkersville, MD, USA). When it was needed, LPS was removed from the sample using Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After removal, the content of LPS was verified again (rDer p 2231 presented 11.83 EU/mL and DpE presented 2.27 EU/mL). Samples of the present work showed lower amounts than the limits recommended in the literature.^{15,16} On days 0 and 7 A/J, mice were sensitized by two subcutaneous injections of DpE (100 µg) adsorbed to 4 mg/mL Al(OH)₃ and diluted in phosphate-buffered saline (PBS). On days 14, 15, 16, 18, 20, 22 and 24 challenge was applied by intranasal instillations of DpE (10 µg in 50 µL of PBS). During sensitization, the negative control group received PBS plus Al(OH)₃, whereas during challenges only PBS was applied. The treatments were performed daily from the 18th to the 24th day of the murine model. The treatment groups were as follows: (i) rDer p 2231 group, which received 25 µg of rDer p 2231 protein diluted in PBS by subcutaneous injections; (ii) the Dexamethasone group, which received Disodium Phosphate (DEXA) 1 mg/kg diluted in PBS; (iii) the Sham-treated group, which received PBS; and (iv) Negative control group received only PBS (Table 1). In the case of days in which treatments coincided with the challenge, the former was performed one hour after the latter. A day after the last challenge/treatment, the animals were euthanized; serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were collected for measurements of IgG1, IgG2a, IgE antibody responses and production of blocking antibodies by indirect ELISA. Eosinophilic peroxidase (EPO) activity was measured by a colorimetric assay.^{11,14} Spleens were collected, processed⁶ and splenocytes (2 x 10⁶ cells/well) were restimulated with 20 µg/mL DpE, 12.5 µg/ml of hybrid protein and parental allergens, 4 EU/ml of LPS or 5 µg/ml phytohemagglutinin (PHA), for 48 or 72 hours.^{6,13} The production of cytokines IL-4, IL-5, IFN-γ and IL-10 was quantified in splenocyte culture supernatants, BALF and lung tissue by standard ELISA as recommended by the manufacturer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Ethical authorization for the use of experimental animals in this study was provided by the local ethics committee (CEUA-ICS/UFBA 137/2018).

Blood collection and antibody detection in mice

Blood samples from the retro orbital plexus of mice were collected after anesthesia was confirmed. Then sera were obtained by centrifugation at 13,000 g at 4 °C for 10 minutes. The samples were stored at -20 °C until use. Dosage of sIgE, specific IgG1 (sIgG1) and specific IgG2 (sIgG2a) were performed through ELISA. In short, DpE (100 µg/mL) or: rDer p 2231, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 (2-5 µg/mL) were coated in 96-well half-area high-binding plates

(Greiner, Cambridge, MA, USA) and incubated overnight (ON) at 4 °C. After this period and washing, the plates were blocked with PBS-T containing 10% FCS at room temperature (RT) for 1 h. After that, mouse individual serum samples were added following dilutions depicted in (Table S3). After another washing, horseradish peroxidase-conjugated antibodies were incubated (see dilutions in Table S3) for 1h to detect sIgG1 and sIgG2a antibodies, and ON for the measurement of sIgE. The reaction between hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) allowed the detection. Reactions were stopped with 4M sulfuric acid and reading of the absorbance was performed at 450 nm.

Analysis of blocking IgG antibodies in chimeric hypoallergen-treated mice

In order to access whether the treatment of mice with the hypoallergenic proteins produced IgG blocking antibodies against DpE, rDer p 1, rDer p 2, and rDer p 23, an inhibition ELISA was performed, as previously described.¹⁷ As it is aforementioned for usual indirect ELISA, coatings, washing steps and blocking were identically carried out, but an additional sample step was needed. The first was the incubation with individual serum of mice (1:20) from hypoallergen-, dexamethasone-, Sham-treated and Control groups for 2h at RT. The second sample step was the incubation of human sera pool diluted 1:10 of 15, 19, 20 and 20 rDer p 1-, rDer p 2, rDer p 23- and DpE-atopic donors, respectively. These sera were incubated ON at 4°C. Then, streptavidin-horseradish peroxidase (1:1000, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) plus biotin-conjugated anti-human IgE (1:9000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were placed in the wells and incubated for 1h at RT. The remaining steps were also identical to the usual and aforementioned ELISA. Lastly, to determine the percentage of inhibition, uninhibited control wells were primarily used to normalize data. Then a calculation was performed, as follows: $100 - (\text{IWEIMC} \times 100 / \text{UCW})$, where IWEIMC and UCW stand for the absorbance of inhibited wells of each individual mice serum and uninhibited control wells, respectively.

Counting of cells from bronchoalveolar lavage fluid

Five hundred microliters of PBS plus 1% of bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were used to wash the lungs through the tracheas of dead mice, as we previously detailed.^{12,13} With this bronchoalveolar lavage fluid (BALF), centrifugation was performed at 2000 g, 10 min, 4°C. While supernatants were stored at -20 °C for later quantification of cytokine and antibodies, the cell pellet was resuspended in 400 µL of PBS-BSA. Using a Neubauer chamber and Trypan blue, total cell counts were performed and with this number cytopsin were carried out as previously published.^{12,13} After Romanowsky–Giemsa staining (Panóticorápido, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) differential count of at least 100 cells was accessed according to standard morphologic criteria, in a blinded fashion. A maximum of

200 μ L of resuspended cells was used for cytopspin and the remaining volume was stored at -70 °C.

Eosinophil peroxidase (EPO) activity in BALF and lung tissue

A colorimetric assay was applied to determine whether EPO activity was as previously delineated.^{12,13} Preceding the test itself and following BALF obtaining, the lungs were washed through the heart using an injection of 5 mL of PBS. Then, the right lobe was sectioned, weighted and macerated in the presence of cold PBS. Afterwards, centrifugation was performed at 1,800 g, 10 min, 4 °C to yield the supernatant, which was collected and stored at -20°C for subsequent quantification of cytokine content and antibodies. Red cell lysis buffer was incubated with residual debris in a final suspension of 10% (w/v) in PBS plus 0.5% HTAB. Not only this sample, but the suspensions from BALF were lysed using a sonicator. Seven cycles of 15 seconds were used with a setting of 25 kHz and the experiment was performed in an ice bath. Centrifugation (1,000 g, 4 °C, 10 min) was carried out in order to yield the supernatants, which were placed in 96-well micro titer plates. Enzymatic substrate solution (1.5 mmol/L o-phenylenediamine and 6.6 mmol/L H₂O₂ in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0) was added and, after thirty minutes of incubation at RT in a dark chamber, the reaction was stopped with citric acid (0.2 mol/L). The absorbance was read at 492 nm.

Measurement of immunoglobulins in BALF and lung tissue

Concerning the quantification of sIgE, sIgG1 and sIgG2a in the aforementioned supernatants of BALF and processed lungs, the same procedure detailed in item 2.9 was applied, but with different dilutions that are described in Table S4.

Splenocytes culture

Lymphocytes were harvested from the spleen, as previously described.¹⁸ Briefly, spleens were homogenized, and after erythrocyte lysis, cells were counted. Splenocytes (2×10^5 cells/well) were restimulated with 20 μ g/mL of DpE and 12.5 μ g / mL of recombinant proteins, LPS or phytohemagglutinin (PHA). Although our samples showed low levels of LPS, we decided to use polymyxin B to block any LPS-related cytokine production. Cultures were performed for 48h or 72h and splenocyte supernatants were collected after this time and stored at -20 for later quantification of cytokines. On the day of the sample collection, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetra-zolium bromide) assay was performed to infer lymphocyte proliferation. One million cells were incubated with 600 μ g/ml of MTT in 100 μ l of RPMI medium in cell culture plates. After 4 h of incubation at 37°C and 5% CO₂, the plates were centrifuged for 5 min at 128 g, 4°C and the supernatants were discarded by inversion. 100 μ l of dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) was added to each well, the

microculture plate was shaken on a plate shaker for 10 min and the optical densities of the reaction mixtures were read with a 490-nm wavelength light. Results were expressed as stimulation index, defined by the ratio: mean absorbance of antigen-stimulated cells / non-stimulated ones for each donor.

Cytokine quantification in BALF, lung tissue and supernatants of cell culture

IL-4, IL-5, IFN- γ , and IL-10 were quantified in the supernatants of BALF, processed lungs and splenocyte culture supernatants by a standard ELISA, as recommended by the manufacturer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Data analysis and statistics

Ratio analyses were performed for comparisons between immunoglobulins isotypes, number of differential cells in BALF and all cytokine measurements. Only mean values were considered in these analyses. In order to enable ratio calculation of concentrations that were below the detectable assay limit or with value of zero, the median value between zero and the reliable lower limit was assigned, as performed by other authors.³⁰

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA, www.graphpad.com). Komogorov-Smirnov test was used for checking the normality of data. When the distribution was parametric, paired t-test was used to verify statistical differences between stimulated and non-stimulated cells. If the distribution was otherwise non-normal, Wilcoxon test was applied.

For detecting differences among the mice groups, the results were analyzed identically, regarding normality verification. However, the one-way ANOVA test with Tukey's or Dunn-s poste tests were used, depending on data distribution. All results were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

REFERENCES

1. Hofer H, Asam C, Hauser M, et al. Tackling Bet v 1 and associated food allergies with a single hybrid protein. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(2):525-533 e510.
2. Kalita P, Lyngdoh DL, Padhi AK, Shukla H, Tripathi T. Development of multi-epitope driven subunit vaccine against *Fasciola gigantica* using immunoinformatics approach. *Int J Biol Macromol*. 2019;138:224-233.
3. Kallberg M, Margaryan G, Wang S, Ma J, Xu J. RaptorX server: a resource for template-based protein structure modeling. *Methods Mol Biol*. 2014;1137:17-27.
4. Santos da Silva E, Marques Ponte JC, Barbosa da Silva M, et al. Proteomic Analysis Reveals Allergen Variability among Breeds of the Dust Mite *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;180(3):159-172.
5. Pinheiro CS, Silva ES, de Andrade Belitardo EMM, et al. En route to personalized medicine: uncovering distinct IgE reactivity pattern to house dust mite components in Brazilian and Austrian allergic patients. *Clin Transl Allergy*. 2021;11(1):e12004.

6. da Silva ES, Aglas L, Pinheiro CS, et al. A hybrid of two major *Blomia tropicalis* allergens as an allergy vaccine candidate. *Clin Exp Allergy*. 2020;50(7):835-847.
7. Barreto ML, Cunha SS, Alcantara-Neves N, et al. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). *BMC Pulm Med*. 2006;6:15.
8. Figueiredo CA, Amorim LD, Alcantara-Neves NM, et al. Environmental conditions, immunologic phenotypes, atopy, and asthma: new evidence of how the hygiene hypothesis operates in Latin America. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1064-1068 e1061.
9. Santos LN, Gallo MB, Silva ES, et al. A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects. *Parasite Immunol*. 2013;35(5-6):188-193.
10. Moreno Amor AL, Santos LN, Alcantara Galvao A, et al. Candidin and trichophytin stimulate the production of Th1 and regulatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells: implication for their use as adjuvants in immunotherapy. *Immunotherapy*. 2014;6(12):1255-1264.
11. Santos Serafim Machado M, Ferreira Silva HB, Rios R, et al. The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kappab) activation. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:168.
12. Oliveira TT, Campos KM, Cerqueira-Lima AT, et al. Potential therapeutic effect of *Allium cepa* L. and quercetin in a murine model of *Blomia tropicalis* induced asthma. *Daru*. 2015;23:18.
13. Costa RS, Carneiro TC, Cerqueira-Lima AT, et al. *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. *Int Immunopharmacol*. 2012;13(1):126-134.
14. Baqueiro T, Russo M, Silva VM, et al. Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. *Respir Res*. 2010;11:51.
15. Malyala P, Singh M. Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *J Pharm Sci*. 2008;97(6):2041-2044.
16. Brito LA, Singh M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. *J Pharm Sci*. 2011;100(1):34-37.

Table S1. Responsive characteristics of the subjects included in the study

Donor Number	SPT (<i>D. pteronyssinus</i>) [†]	<i>D. pteronyssinus</i> -specific IgE (kU/L) [‡]	Class
#01	+	24.6	4
#02	+	49.9	4
#03	+	70	5
#04	+	54.2	5
#05	+	70	5
#06	+	100	5
#07	+	100	5
#08	+	100	5
#09	+	55.5	5
#10	+	38.7	4
#11	+	18.2	4
#12	+	1.16	2
#13	+	27	4
#14	+	17.08	3
#15	+	4.86	3
#16	+	77.3	5
#17	+	4.05	3
#18	+	24.5	4
#19	+	43.5	4
#20	+	14.02	3
#21	+	0.85	2
#22	+	6.01	3
#23	+	6.08	3
#24	+	3.02	2
#25	+	5.78	3
#26	+	19.6	4
#27	+	4.14	3

† - SPT - skin prick test, *D. pteronyssinus* extracts from Alergolatina Produtos Alergênicos Ltd, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, were used. The test was considered to be positive (+) if the diameter of the weal was at least 3 mm greater than the saline control;

‡ - IgE specific-levels were measured by ImmunoCAP (D1, Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden).

Table S1. Continued

Donor Number	SPT (<i>D. pteronyssinus</i>) [†]	<i>D. pteronyssinus</i> -specific IgE (kU/L) [‡]	Class
#28	+	8.79	4
#29	+	3.08	2
#30	+	0.63	1
#31	-	0	0
#32	-	0	0
#33	-	0.12	0
#34	-	0.14	0
#35	-	0.2	0
#36	-	0.17	0
#37	-	0	0
#38	-	0	0
#39	-	0	0
#40	-	0.14	0
#41	-	0.21	0
#42	-	0	0

† - SPT - skin prick test, *D. pteronyssinus* extracts from Alergotina Produtos Alergênicos Ltd, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, were used. The test was considered to be positive (+) if the diameter of the weal was at least 3 mm greater than the saline control;

‡ - IgE specific-levels were measured by ImmunoCAP (D1, Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden).

Table S2. Responsive characteristics of the PBMC donors

Donor Number	SPT (<i>D. pteronyssinus</i>) [†]	<i>D. pteronyssinus</i> -specific IgE (kU/L) [‡]	Class	rDer p 1 (ALEX®) sIgE (kUA / L) [§]	rDer p 2 (ALEX®) sIgE (kUA / L) [§]	rDer p 23 (ALEX®) sIgE (kUA / L) [§]
#10	+	38.7	4	15.07	19.65	13.42
#09	+	55.5	5	16.55	31.06	19.05
#21	+	0.85	2	1.09	4.13	0.31
#26	+	19.6	4	2.24	2.4	3.38
#28	+	8.79	3	3.27	1.73	0.82
#27	+	4.14	3	6.48	0.48	0.48
#31	-	<0.10	0	<0.19	<0.19	<0.19
#32	-	<0,10	0	<0.19	<0.19	<0.19
#37	-	<0.10	0	<0.19	<0.19	<0.19
#38	-	<0.10	0	<0.19	<0.19	<0.19
#39	-	<0.10	0	<0.19	<0.19	<0.19
#42	-	<0.10	0	<0.19	<0.19	<0.19

† - SPT - skin prick test, *D. pteronyssinus* extracts from Alergolatina Produtos Alergênicos Ltd, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, were used. The test was considered to be positive (+) if the diameter of the weal was at least 3 mm greater than the saline control;

‡ – IgE specific-levels were measured by ImmunoCAP (D1, Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden);

§ - ALEX® - MadXmacroarray diagnostic. The test was considered to be positive > 0.19.

Table S3. Sera and secondary antibody dilutions

Antigen	Target antibody	Sera dilution [†]	Secondary antibodies dilution ^{‡‡}
	IgG1	1:3,200	1:2000
DpE	IgG2a	1:25	1:1,000
	IgE	1:5	1:500
	IgG1	1:25	1:2,000
rDer p 2231	IgG2a	1:12.5	1:1,000
	IgE	1:5	1:500
	IgG1	1:50	1:2,000
rDer p 1	IgG2a	1:12.5	1:1,000
	IgE	1:5	1:500
	IgG1	1:25	1:2,000
rDer p 2	IgG2a	1:12.5	1:1,000
	IgE	1:5	1:500
	IgG1	1:25	1:2,000
rDer p 23	IgG2a	1:12.5	1:1,000
	IgE	1:5	1:500

† - Determined by titration curves; ‡‡ - anti-mouse IgE (Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-mouse IgG1 (Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-mouse IgG2a (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Table S4. Dilutions of samples and secondary antibodies used in ELISA assays

Sample source	Antigen	Target antibody	Sample dilution [†]	Secondary antibodies dilution ^{‡‡}
Lungs	DpE	IgG1	1:100	1:1,000
		IgG2a	1:12.5	1:1,000
		IgE	1:2	1:250
		IgG1	1:10	1:1,000
		IgG2a	1:2.5	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
	rDer p 2231	IgG1	1:10	1:1,000
		IgG2a	1:2.5	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
		IgG1	1:10	1:1,000
		IgG2a	1:2.5	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
BALF	rDer p 1	IgG1	1:10	1:1,000
		IgG2a	1:2.5	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
		IgG1	1:10	1:1,000
		IgG2a	1:2.5	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
	rDer p 23	IgG1	1:10	1:1,000
		IgG2a	1:2.5	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
		IgG1	1:50	1:1,000
		IgG2a	1:5	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
BALF	rDer p 1	IgG1	1:6.25	1:1,000
		IgG2a	1:1.25	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
		IgG1	1:6.25	1:1,000
		IgG2a	1:1.25	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
	rDer p 2	IgG1	1:6.25	1:1,000
		IgG2a	1:1.25	1:1,000
		IgE	Pure	1:250
		IgG1	1:6.25	1:1,000
		IgG2a	1:1.25	1:1,000
		IgE	Pure	1:250

[†] - Determined by titration curves; ^{‡‡} - anti-mouse IgE (Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-mouse IgG1 (Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-mouse IgG2a (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). BALF – bronchoalveolar lavage fluid;

Figure Legends

Figure S1. Expression and purification of rDer p 1 and human sIgE reaction to wild -type allergens blocker assay. **A:** Expression and purification of rDer p 1: Lane 1: before induction with IPTG; Lane 2: after IPTG (1 mmol / L), 6 h induction; Lane 3: soluble fraction of bacterial extract; Lane 4: solubilized bacterial pellet (6 mol/L urea); Lane 5: Representative sample from size exclusion chromatography. Chromatogram of rDer p 1 protein purification using size exclusion chromatography. **B:** Reactivity of IgE to DpE, rDer p 1, rDer p 2 end rDer p23 in serum reactive to *D. pteronyssinus* with their respective cut-off lines and reactivity percentage.

Figura S2. In vivo responses of the hypoallergenic hybrid rDer p 2231 in BALF and lung. **A:** IgE specific for IgG1, IgG2a and DpE in lung. **B:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 2231 in lung. **C:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 1 in lung. **D:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 2 in lung. **E:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 23 in lung. **F:** IgE specific for IgG1, IgG2a and DpE in BALF. **G:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 2231 in BALF. **H:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 1 in BALF. **I:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 2 in BALF. **J:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 23 in BALF. **F:** Heat map of the proportion of antibodies in the BALF. **F:** Heat map of the proportion of antibodies in the lung. # - Comparisons with the Control group; * - Comparisons in relation to the Sham group; & - Comparisons in relation to the group treated with dexamethasone. The number of symbols represents the degree of significance when ANOVA with Tukey's post-test or Kruskal-Wallis with Dunn's post-test were used, depending on the data distribution. One symbol, $P < 0.05$; two symbols $P < 0.01$; three symbols $P < 0.0001$; and four symbols $P < 0.00001$.

Figure S1

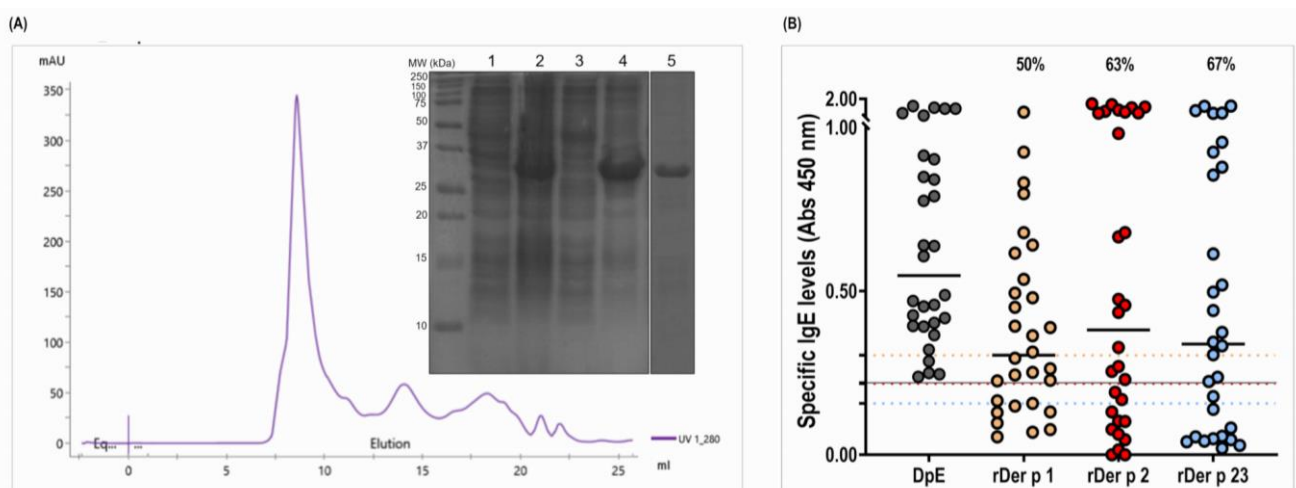
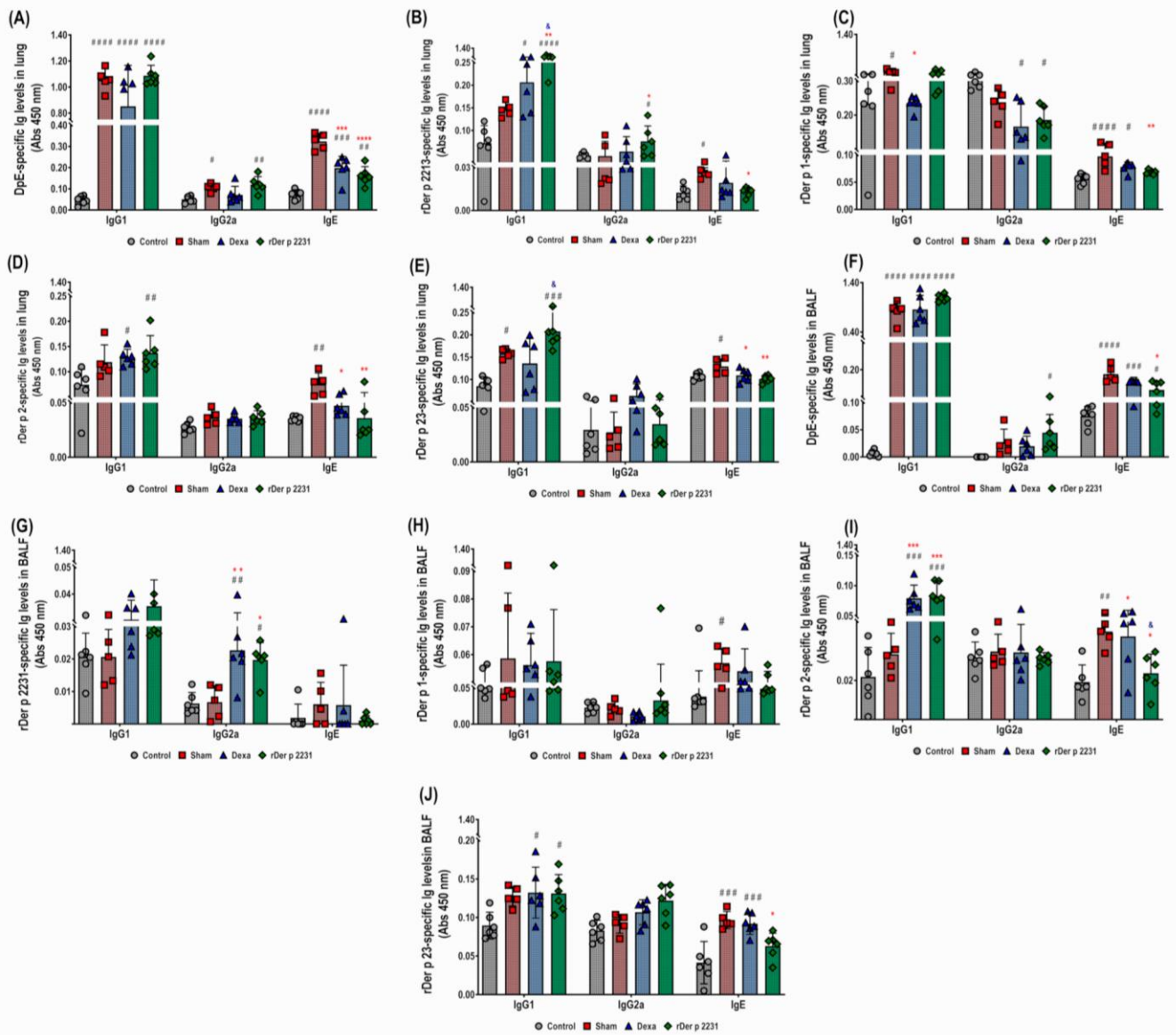


Figure S2



CAPÍTULO II

Manuscrito 02 – A ser submetido na revista molecular-immunology
(Fator de impacto 3.97)

**Immunotherapy with hypoallergenic chimeric protein induces protective effect
in a Dermatophagoides pteronyssinus murine model of chronic asthma**

Immunotherapy with hypoallergenic chimeric protein induces protective effect in a *Dermatophagoides pteronyssinus* murine model of chronic asthma

Antônio Márcio Santana Fernandes^{a,b}, Eduardo Santos da Silva^a, Raphael Chagas Silva^a, Elisânia Fontes Silveira^a, Leonardo Freire Santiago^a, Emília Maria Medeiros de Andrade Belitardo^a, Vitor dos Santos Alves^a, Deise Souza Vilas-Bôas^c, Luiz Antônio Rodrigues de Freitas^d, Fatima Ferreira^e, Alain Jacquet^f, Luis Gustavo Carvalho Pacheco^{a,b}, Neuza Maria Alcantara-Neves^{a,b}, Carina Silva Pinheiro^{a,b,*}

^a Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^b Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^c Departamento de Biomorfologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Bahia, Brazil

^d Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil

^e Department of Biosciences and Medical Biology, University of Salzburg, Salzburg, Austria

^f Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

* Corresponding author's address: Laboratory of Allergy and Acarology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia. Avenida Reitor Miguel Calmon, S/n, Vale do Canela, CEP: 40110-100. Salvador, Bahia, Brazil. <https://orcid.org/0000-0001-5623-1308>. E-mail: carina.pinheiro@ufba.br

ORCID:

AMSF: <https://orcid.org/0000-0001-8839-3395>

ESS: <https://orcid.org/0000-0003-0247-9505>

EFS: <https://orcid.org/0000-0003-4936-5986>

EMMAB: <https://orcid.org/0000-0003-0818-1582>

LFS: <https://orcid.org/0000-0002-0085-1310>

RCS: <https://orcid.org/0000-0001-9717-3394>

VSA: <https://orcid.org/0000-0002-3828-7006>

FF: <https://orcid.org/0000-0003-0989-2335>

AJ: <https://orcid.org/0000-0002-0980-9741>

LGCP: <https://orcid.org/0000-0003-2500-0800>

NMAN: <https://orcid.org/0000-0002-2102-260X>

Other author's e-mails:

AMSF: marciofernandes14@gmail.com
ESS: eduardossilva06@gmail.com
EFS: elissfontess@gmail.com
EMMAB: emilia_mandrade@hotmail.com
LFS: leonardofsantiago@gmail.com
RCS: raphaschagas@hotmail.com
VSA: alvesvitor@usp.br
DSVB: vilasboasdeise@gmail.com
FF: fatima.ferreira@sbg.ac.at
AJ: Alain.J@chula.ac.th
LGCP: lgcpacheco@gmail.com
NMAN: neuzalcantara@gmail.com

Acknowledgments

This work was supported by grants from Bahia the Research Support Foundation (FAPESB) APP0004/2016, AMSF was recipient of a fellowship from FAPESB grant BOL0320/2018.

Abstract

Background

The mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, the most important house dust mite (HDM) associated with asthma worldwide, has been seen as key trigger in terms of inducing the pathophysiology of allergic asthma. The hybrid hypoallergen (termed rDer p 2231) consisting of T cell epitopes of the *D. pteronyssinus* major allergens Der p 1, Der p 2 and Der p 23 was previously evaluated in an acute allergy model, showing promising results. However, the acute model does not induce proper remodeling in the lung therefore, to understand the benefits of rDer p 2231 treatment, the goal of this work was; to test the hypoallergenic and immunogenic characteristics of rDer p 2231 in a murine model of chronic asthma induced by *D. pteronyssinus*.

Methods:

We verified the potential of rDer p 2231 to attenuate inflammation and airway remodeling in a model of chronic asthma induced by *D. pteronyssinus*. A/J male mice (n = 9 to 10) were sensitized with subcutaneous injections on days 0, 7, 14 and 21 and by intranasal instillations on days 27, 29 and 31. Challenges occurred twice weekly for 3 months via intranasal instillations. Treatment with rDer p 2231 was performed for 3 months, five days a week, using the subcutaneous route. Levels of IgE, IgG1, IgG2a were verified, as well as IL-4, IL-5, IFN- γ , and IL-10 levels in lung and splenocytes. Histopathological investigations of the chronic inflammatory response were also performed by assessing

inflammation and airway remodeling parameters of lung sections using staining approaches.

Results:

The use of the hybrid molecule rDer p 2231 as a therapeutic vaccine led to a reduction in IgE production, as well as in the number of eosinophils and neutrophils, a lower activity of eosinophilic peroxidase in the airways and an increase in the production of IgG1 and IgG2a antibodies. Those IgG antibodies may have acted as blockers of the binding of IgE to parental allergens in the sera of atopic patients. rDer p 2231-stimulated splenocytes from mice treated with rDer p 2231 to secrete higher levels of Th1 and regulatory cytokines, as well as reduced secretion of Th2 cytokines. Histopathological investigation of the lower airways revealed a reduction in smooth muscle hyperplasia, fibrosis in the subbasal membrane and hyperplasia of mucus-producing goblet cells.

Conclusion:

rDer p 2231 has shown a potential to be used as an allergy vaccine in future clinical trials with asthmatic humans, given that it achieved several efficacy parameters, restoring and balancing Th1/Th2 immune responses, specially changing airway remodeling factors.

Keywords: Airway remodeling, allergen-specific immunotherapy, Asthma, Hypoallergen, Immunogenicity

1 INTRODUCTION

Allergic asthma is a highly prevalent inflammatory airway disorder characterized by reversible airflow obstruction and bronchial hyperresponsiveness (Heffler et al., 2020; Zheng et al., 2021). Exposure to aeroallergens triggers reactions that stimulate and induce the pathophysiology of allergic asthma (Agache et al., 2019; Kang et al., 2016). Currently available therapies combine anti-inflammatory mediators, anti-inflammatory drugs and newly approved immunobiologics such as monoclonal antibodies (Kang et al., 2016; Silkoff et al., 2015; Virchow, 2019). Medications temporarily suppress symptoms and the ongoing inflammatory process, but do not affect the course of the disease (Agache et al., 2019; Pfaar et al., 2018b).

Allergen-specific immunotherapy (AIT) is the only treatment for allergic diseases capable of preventing the onset of new allergic sensitization and disease progression (Dhami et al., 2017; Pfaar et al., 2018b; Virchow, 2019), resulting in improvement of symptoms and decreasing need for pharmacotherapy (Globinska et al., 2018; Pfaar et al., 2018a; Virchow, 2019).

AIT is currently performed using natural allergenic extracts, which brings several limitations in its use, related to safety, efficacy, long treatment and adherence (Klimek et al., 2012; Valenta et al., 2016; Valenta et al., 2018). A series of assays using recombinant T cell epitope hypoallergens has been proposed as an innovative approach to improve SIT protocols (Hoyne et al., 1993; Mackenzie et al., 2013; Prickett et al., 2015). This technology is based in modulation of specific responses to allergens without the activation of effector cells mediated by IgE, in a safe, effective and convenient process for patients (Hoyne et al., 1993; Larche, 2014; Prickett et al., 2015; Takaiwa, 2021). However, the use of recombinant hypoallergenic hybrids, including those with design based in T cell epitopes, must undergo preclinical and clinical studies before approval for routine use in AIT (Silva et al., 2020).

Preclinical *in vivo* studies using house dust mite (HDM) allergens as an allergy inducer usually use short-term trials, obtaining characteristics of airway inflammation and hyperresponsiveness, but not remodeling (Asturias et al., 2009; Cates et al., 2004; K. W. Chen et al., 2012; Couroux et al., 2015; Gupta et al., 2014; Huang et al., 2019; Martinez et al., 2018; Pellaton et al., 2013; Prickett et al., 2015; Prickett et al., 2011; Silva et al., 2020; Zhao et al., 2014). Murine models of asthmatic inflammation with chronic responses following exposure to HDM have been proposed, with the objective to examine inflammatory processes and airway remodeling (Ahn et al., 2007; Piyadasa et al., 2016). Airway remodeling occurs during early tissue repair in response to continued allergic inflammation (Ahn et al., 2007; Davies et al., 2003).

Recognized as the most important asthma-associated house dust mite (HDM) worldwide, *Dermatophagoides pteronyssinus* induces the development of high titer allergen-specific IgE (Agache et al., 2019; Kowal et al., 2020; Posa et al., 2017). The high epidemiological prevalence of *D. pteronyssinus* makes it necessary to develop new vaccines, especially those designed as recombinant hybrid hypoallergenic of T cell epitopes (Batard et al., 2016; Posa et al., 2017; Prickett et al., 2015; Silva et al., 2020), as well as using them in murine models of HDM-induced chronic asthmatic inflammation. Our group recently tested, using *in vitro* and *in vivo* experiments, a multicomponent hypoallergenic hybrid molecule with the potential to treat patients co-sensitized with the major allergens Der p 1, Der p 2 and Der p 23. This hypoallergenic was termed rDer p 2231, and is based on T cell epitopes of these allergens (in submission). These are considered the three major allergens of *D. pteronyssinus*, as they have high allergenic activity, leading to more than 50% of IgE reactivity in allergic patients (Kowal et al., 2020; Posa et al., 2017). Previous results indicated that rDer p 2231 had a reduced ability to bind human IgE, and produce this antibody in treat mice, as well as it modulated TH2 responses in human and murine cells, indicating that the hypoallergen kept the T cell

proliferation features. Herein, we have tested the hypoallergenic and immunogenic characteristics of rDer p 2231 in a *D. pteronyssinus*-induced chronic asthma allergy model. This is the first proposed murine model, which uses HDM to induce chronic asthma in mice and treats them with a hypoallergenic protein, in order to confirm rDer p 223 as a promising immunotherapeutic agent.

2 METHODS

2.1 Allergens

All recombinant allergens exhibited the same IgE binding capacity as their natural counterparts, except rDer p 2231. The hypoallergen rDer p 2231 and the recombinant allergen rDer p 1 mature were produced and purified *in-house*. The IgE reactivity from the rDerp 1 was compared with the natural Derp 1 (Indoor biotechnologies, Virginia, United States). rDer p 2 and rDerp 23 were kindly provided by the Department of Molecular Biology, University of Salzburg, Austria and by the Department of Medicine Chulalongkorn University, Thailand, respectively.

2.2 *D. pteronyssinus* extract (DpE)

This procedure followed in part our own previous report (Santos da Silva et al., 2019). Briefly, commercial available mites (Stallergenes Greer Ltd, London, United Kingdom) were weighted and 5 g of lyophilized *D. pteronyssinus* (DpE) was diluted in 40 mL of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4. This solution was grounded for 3 min using a blender (Waring Commercial, Torrington, CT, USA), followed by centrifugation at 13,000 g, 4°C for 20 min. Then, three cycles of incubation for 30 min with diethyl ether (PA ACS; Hexis Científica, Jundáí, Brazil) and centrifugation at 13,000 g for 20 min were performed in order to delipidate the supernatants. The amount of protein in the somatic extract was quantified by bicinchoninic acid (BCA) assay (Smith et al., 1985). The concentration of Der p 1 in DpE was 15.12 ng of protein. The somatic extract was stored at -20 °C until use.

2.3 Treatment protocol in a chronic *in vivo* allergy model

Based on a previously described chronic model of allergy (Kang et al., 2016), we verified the potential of rDer p 2231 to attenuate airway inflammation. In summary, male mice of the A/J strain at 6 weeks of age and weighing 20 to 25 g were used (n = 9 to 10 mice per group). Mice were assigned to one of the following three treatment groups: (1) Control Group; (2) Sham treatment group; (3) rDer p 2231 treatment group (Table 1). First, mice were sensitized on days 0, 7, 14 and 21 with subcutaneous injections containing 100 µg

of DpE adsorbed to 4 mg/mL Al(OH)₃ (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA). Additional sensitizations by intranasal instillations with DpE (10 µg in 50 µL of PBS), which were made on days 27, 29 and 31. Challenges with DpE (intranasal route) were then performed twice a week for 3 months. Treatment was carried out for 3 months, 5 days a week, as described below. Mice from the rDer p 2231 treatment group, sensitized and challenged with DpE, were treated with subcutaneous injections of 25 µg rDer p 2231 diluted in PBS. The Sham treatment group, sensitized and challenged with DpE, received injections with PBS during treatments. It is important to note that during all stages, animals from the Control Group received PBS (plus Al(OH)₃ in the case of sensitization). Animals were sacrificed with intraperitoneal injections of xylazine (5-10 mg/kg/body weight) and ketamine (80-100 mg/kg/body weight) 24 hours after the last challenge. Blood samples were collected via submandibular puncture on days 0, 26, 32 and at the end of each month of treatment.

The endpoint chromogenic LAL assay (Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit; Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA) was used to quantify endotoxins in DpE and rDer p 2231 protein, (Brito and Singh, 2011; Malyala and Singh, 2008). Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) was used for LPS removal. The Ethics Committee for the Use of Experimental Animals of the Institute of Health Sciences of the Federal University of Bahia approved these animal experiments (CEUA 8373280920).

2.4 Blood collection and antibodies detection

Mouse blood samples were centrifuged at 13,000 g at 4 °C for 10 minutes for serum obtaining. The sera were stored at -20 °C until use. Dosage of sIgE, specific IgG1 (sIgG1) and specific IgG2 (sIgG2a) were performed through Indirect ELISA. In short, DpE (100 µg/mL) or rDer p 2231, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 (2-5 µg/mL) were coated in 96-well half-area high-binding plates (Greiner, Cambridge, MA, USA) and incubated overnight at 4 °C, the plates then were blocked with PBS-T containing 10% FBS at room temperature (RT) for 1 h. After that, mouse individual serum samples were added following dilutions depicted in (Table A1). After another washing, horseradish peroxidase-conjugated antibodies were incubated (see dilutions in Table A1) for 1h to detect sIgG1 and sIgG2a antibodies, and overnight for the measurement of sIgE. The reaction between hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was then developed. Reactions were stopped with 4M sulfuric acid and reading of the absorbance was performed at 450 nm.

2.5 Blocking IgG antibodies and IgE avidity index in a chronic model of allergy

In order to access if the treatment of mice with the hypoallergenic proteins produced IgG blocking antibodies against Dp Extract, rDer p 2231, rDer p 1, rDer p 2, and rDer p 23, an inhibition ELISA was performed, as previously described (Aglas et al., 2020). As it is aforementioned for usual indirect ELISA, coatings, washing steps and blocking were identically carried out, but it needed an additional sample step. The first was the incubation with individual serum of mice (1:20) from hypoallergen-, Sham-treated, and Control groups for 2h at RT. The second step was the incubation with the pool of sera from atopic individuals (Table A2) diluted 1:10. These sera were incubated overnight at 4°C. Then, streptavidin-horseradish peroxidase (1:1000, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) plus biotin-conjugated anti-human IgE (1:9000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were placed in the wells and incubated for 1h at RT. The remaining steps were also identical to the usual and aforementioned Indirect ELISA. Lastly, to determine the percentage of inhibition, uninhibited control wells were primarily used to normalize data. Then a calculation was performed, as follow: $100 - (\text{IWEIMC} \times 100 / \text{UCW})$, where IWEIMC and UCW stands for the absorbance of inhibited wells of each individual mice serum and uninhibited control wells, respectively.

To determine IgE avidity, the thiocyanate elution ELISA (KSCN) assay was performed as described (El-Khouly et al., 2007). The Dp Extract antigen was used to coat the plate, as in the usual indirect ELISA washing steps and blocking were performed identically. An additional step was carried out, with the addition of the KSCN curve (0.125M-4), under stirring for 30 minutes. Avidity indices (AI) for each hybrid protein and parent allergens were obtained and used to compare the concentration of KSCN needed to interfere 50% of the allergen-antibody interaction.

2.6 Counting of cells from bronchoalveolar lavage fluid

Five hundred microliters of PBS plus 1% of bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were used to wash the lungs through the tracheas of the dead mice, as we previously detailed (Oliveira et al., 2015; Santos Serafim Machado et al., 2015). With this bronchoalveolar lavage fluid (BALF), centrifugation was performed at 2000 g, 10 min, 4°C. Supernatants were stored at -20 °C for later quantification of cytokine and antibodies. Cell pellet was resuspended in 400 µL of PBS-BSA. Using a Neubauer chamber and Trypan blue, total cell counts were performed and, with this number, cytopspin were carried out as previously published (Oliveira et al., 2015; Santos Serafim Machado et al., 2015). After Romanowsky–Giemsa staining (Panóticorápido, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) differential counts of at least 100 cells were accessed

according to standard morphologic criteria, in a blinded fashion. A maximum of 200 μL of resuspended cells were used for cytopspin and the remaining volume was stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.7 Eosinophil peroxidase (EPO) activity and specific IgA in BALF and lung tissue

A colorimetric assay was applied to determine EPO activity, as formerly delineated (Oliveira et al., 2015; Santos Serafim Machado et al., 2015). Preceding the test itself and followed BALF obtaining, the lungs were washed through the heart using an injection of 5 mL of PBS. Then, the right lobe was sectioned, weighted and macerated in the presence of cold PBS. Afterwards, centrifugation was performed at 1,800 g, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to obtain the supernatant, which was collected and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent quantification of cytokines and antibodies. Red cell lysis buffer was incubated with residual debris in a final suspension of 10% (w/v) in PBS plus 0.5% HTAB. This sample, and the suspensions from BALF were lysed using a sonicator. Seven cycles of 15 seconds were used with a setting of 25 kHz. Centrifugation (1,000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) was carried out in order to obtain the supernatants, which were placed in 96-well microtiter plates. Enzymatic substrate solution (1.5 mmol/L o-phenylenediamine and 6.6 mmol/L H_2O_2 in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0) were added and, after thirty minutes of incubation at RT in a dark chamber, the reaction was stopped with citric acid (0.2 mol/L). The absorbance was read at 492 nm.

2.8 Splenocytes culture

Splenocytes were harvested from the spleen as previously described (da Silva et al., 2020b). Briefly, spleens were homogenized, and after erythrocyte lysis, cells were counted. Splenocytes (2×10^5 cells/well) were restimulated with 20 μg / mL of Dp Extract and 12.5 μg / mL of recombinant proteins, phytohemagglutinin (PHA). Even though our samples had shown low levels of LPS, we decided to use polymyxin B to block any LPS-related cytokine production. Cultures were performed for 48h or 72h and splenocyte supernatants were collected after this time and stored at -20 for later quantification of cytokines. On the day of the samples collection MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetra-zolium bromide) assay was performed to infer lymphocyte proliferation. One million cells were incubated with 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of MTT in 100 μl of RPMI medium in cell culture plates. After 4 h of incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 . After that, the plates were centrifuged for 5 min at 128 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatants were discarded by inversion, 100 μl of dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, United States) were added to each well, and the microculture plate was shaken for 10 min. The absorbance was read at 492

nm. Results were expressed as stimulation index, defined by the ratio: mean absorbance of antigen-stimulated cells / unstimulated ones for each donor.

2.9 Cytokines quantification in BALF, lung tissue and supernatants of cell culture

IL-4, IL-5, IFN- γ , and IL-10 were quantified in the supernatants of BALF, processed lungs and splenocyte culture supernatants a standard ELISA, as recommended by the manufacturer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

2.10 Morphological analysis

Histopathological parameters of chronic inflammatory response were investigated by assessment of airway inflammation and airway remodeling (quantitative analysis of collagenous extracellular matrix and contractile tissue). The histopathological parameters included cell infiltration, mucus production, subepithelial fibrosis, elastic fibers and peribronchial smooth muscle, evaluated as described previously (Ahn et al., 2007; Ellis et al., 2003; Leick-Maldonado et al., 2004; Tanaka et al., 2001). The right lobe of the lung was resected and immediately fixed in 10% neutral buffered formalin for a minimum of 24 and a maximum of 36 hours. Paraffin embedded tissue sections were prepared with four-micrometer-thick-sections and stained for morphological analysis. (Santos Serafim Machado et al., 2015) Histopathological parameters of chronic inflammatory response were investigated by assessment of airway inflammation and airway remodeling.

Hematoxylin and Eosin staining was performed to assess the fibroblasts/myofibroblasts and residual inflammatory infiltration, as described previously (Leick-Maldonado et al., 2004). In short, in order to assess peribronchial inflammatory infiltration, mononuclear cells distributed in submucosa and adventitia layers were quantified in three randomly selected areas of airway, involving at least three to five airways of each animal. The results were expressed as cells/unit area ($10^4 \mu\text{m}^2$). Additionally, fibroblasts/myofibroblasts in the lamina propria of the same airway areas were used to measure inflammatory infiltration.

Periodic Acid-Schiff (PAS) staining was performed to assess overproduction of mucus, inferred by changes of goblet cells in the bronchus epithelium, as follows: A 5-point scoring system was applied (absence of goblet cells – grade 0; less than 25% - grade 1; 25 to 50% - grade 2; 50 to 75% - grade 3; above 75% or complete bronchus obstruction by mucus - grade 4) (Tanaka et al., 2001). For each sample, five fields of view were examined for quantification and five to ten independent measurements per bronchi were developed.

Masson's Trichrome and Picrosirius Red were performed to assess collagen deposition in remodeling. Particularly, Masson's Trichrome was used to measure bronchial epithelial sub basement membrane due to fibrosis (subepithelial fibrosis) and thickness of bronchiolar smooth muscle layer (x200) (Ellis et al., 2003). Collagen deposition was analyzed by Picrosirius Red in polarizing microscopy. Additionally, Weigert's resorcin-fuchsin stain was performed to demonstrate elastic fibers at x400 magnification, as previously described with modifications (Florencio et al., 2019).

Morphological analysis was conducted blindly, in relation to protocol design. Only equivalent sized and rounded shaped bronchio were preferentially considered (Ahn et al., 2007). All histological evaluations were performed with a digital imaging system containing a microscope Nikon Eclipse E-200 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) and camera Tucsen (da Silva et al., 2020a).

3 RESULTS

3.1 rDer p 2231 reduces IgE levels and increases Ig1 and IgG2a production in mice submitted to a chronic model of *D. pteronyssinus* allergy

The schedule detailed in Figure 1A was used to sensitize, challenge, and treat mice subjected to a mice model of *D. pteronyssinus*-induced chronic asthma and treated with the therapeutic hypoallergen rDer p 2231. Figure A1 details the response curve of (A) sIgE, (B) sIgG1 and (C) sIgG2a anti-Dp Extract and parental allergens of rDer p 2231, from day zero to euthanasia. Figure 1 shows an increase in IgE, IgG1 and Ig2a levels in all groups that were induced allergy (Sham and rDer p 2231) from the 26th day of the experimental model. The serum levels of these antibodies in the reported groups remained until the 32nd day, which corresponds to two days after the 3rd challenge. In Figure A1 there is a gradual decrease in sIgE in the group treated with rDer p 2231, from the 61st, 89th and 125th day, which corresponds to the 1st, 2nd, and 3rd month of treatment with the hypoallergen rDer p 2231. The group of Sham treatment, kept sIgE levels high and stable throughout the protocol. The Control Group had no sIgE responses. Figure A1 B-C display the increase in the sIgG1 and sIgG2a serum levels from the 26th day of the protocol, remaining elevated in the group treated with rDer p 2231, throughout treatment with the hypoallergenic. Serum levels of sIgG1 and sIgG2a in the Sham Group remained stable throughout the protocol. The Control Group showed no difference in serum antibody. Treatment with rDer p 2231 led to significantly reduced levels of Dp Extract-sIgE, rDer p 1-sIgE, rDer p 2-sIgE and rDer p 23-sIgE when compared to the Sham treatment group (Figure 1B-F). The Sham Group, when

compared to the Control Group, presented high and significant levels of Dp Extract-sIgE, rDer p 1-sIgE, rDer p 2-sIgE and rDer p 23-sIgE.

At the end of the protocol, treatment with rDer p 2231 produced significantly increased levels of sIgG1s and sIgG2a (anti-Dp Extract, anti-rDer p 2231 and their parental allergens), both in comparison to the Control Group and compared to the group of Sham treatment (Figure 1B-F). The Sham Group showed a significant increase in comparison to the Control Group, in the levels of Dp Extract-sIgG1, rDer p 2231-sIgG1, rDer p 1-sIgG1, rDer p 2-sIgG1 and Dp Extract-sIgG2a, rDer p 1-sIgG2a and rDer p 2-sIgG2a.

3.2 Sera from mice treated with rDer p 2231 in a chronic model of allergy showed blocking activity and induced low IgE avidity activity

The ability of sIgG produced by treated mice to inhibit the binding of human IgE to parental allergens was verified by an inhibition ELISA. As shown in Figure 1G, pre-incubation with sera from treated mouse produced a significant reduction in the IgE binding capacity of rDer p 1, rDer p 23 and Dp Extract reactive human sera, compared to Sham and Control groups. Additionally, there was only a trend for rDer p 2. These findings suggest that in the proposed chronic model the treatment with rDer p 2231 was able to generate blocking antibodies against the reported antigens.

We have also evaluated the IgE avidity to Dp Extract, given that in the mice group treated with rDer p 2231 the sIgE was not reduced as strongly as the parental allergens. As shown in Figure 1H, the concentration of KSCN required to elute 50% of the allergen-antibody interaction in Dp Extract was significantly lower when compared to the Sham treated group.

3.3 Mice treated with rDer p 2231 showed a significantly reduced number of inflammatory cells in the BALF

To investigate the changes in the airways of treated mice, an inflammatory immune cell count and an assessment of the eosinophil peroxidase activity present in the BALF and Lung were performed. Figure 2A, presents the data of BALF total cell counts, showing a significant increase in the number of these cells among the mice of the Sham Group compared to the animals of the Control Group. Mice treated with rDer p 2231 showed a significant decrease in the total number of these cells compared to animals in the Sham group. Figure 2B explores the distribution of leukocytes in BALF. It is possible to observe a significant decrease in eosinophils and neutrophils and a significant increase in lymphocytes and macrophages in the group of mice treated with rDer p 2231, when compared to the Sham group. We observed that the ratio analysis for the differential

counting revealed that the treatment with rDer p 2231 was associated with a significantly higher number of lymphocytes over the low number of macrophages (Figure 2C).

The data on the count of inflammatory immune cells and the number of leukocytes present in the BALF correlates with the findings of the Eosinophil Peroxidase (EPO) activity profile verified in the BALF and in the Lung (Figure 2D). Notably, mice treated with rDer p 2231, when compared with the Sham treatment group, showed a significant decrease in EPO activity in both BALF and lung.

3.4 Splenocytes from mice stimulated with rDer p 2231 reduced the expression of Th2 cytokines and induced high levels of IL-10 and IFN- γ

As shown in Figure 3A,B, after three months of treatment, lung tissue and BALF of mice from rDer p 2231 group showed significantly elevated levels of IL-10 and IFN- γ , when compared with Sham treatment group, and significantly reduced IL-4 and IL-5.

Splenocytes from mice were stimulated with Dp Extract, rDer p 2231, their parental allergens and PHA. These stimuli were initially compared with unstimulated cells from the own treatment group, presenting the following results (Figure 3C-F): (i) The Control Group displayed a significant increase only for IFN- γ when stimulated with rDer p 2231. The other cytokines IL-10, IL-4 and IL-5 showed no statistical differences; (ii) the Sham group had a significant increase in IL-10 in cells when stimulated with rDer p 1, rDer p 2 and Dp Extract. Significantly increased levels of IFN- γ for Der p 1 and a reduction for rDer p 23 were also observed. IL-4 showed a significant increase for stimuli with Dp Extract and rDer p 2231 and a tendency to increase for rDer p 23. On the other hand, IL-5 had a significant increase only for rDer p 2231; (iii) the group treated with rDer p 2231 showed a significant increase of IL-10 for all stimuli. There was a significant increase in IFN- γ in cells stimulated with parental allergens and Dp Extract, and a tendency to increase in stimulus with rDer p 2231. For IL-4 there was a significant reduction in stimuli with parental allergens, Dp Extract and a tendency to decrease in stimulus with rDer p 2231. A significant reduction in IL-5 for the stimuli with rDer p 1, rDer p 23 and a tendency of reduction in the stimuli with rDer p 2, rDer p 2231 and Dp Extract were also observed. PHA stimulus had a significant increase over unstimulated cells for all cytokines tested across all treatment groups. The stimuli not mentioned within each group did not show statistical differences. Figure 3C-F also shows the baseline splenocyte values of mice from the Sham treatment group.

The stimuli from the group treated with rDer p 2231 were initially compared with the stimuli from the Control Group (Figure 3C-F). Basal IL-10 production was high and significant in unstimulated cells, when stimulated with Dp Extract, rDer p 2231 and all parental allergens. IFN- γ had basal levels significantly increased for rDer p 1, rDer p 23

and rDer p 2231. For IL-4, basal production was significantly reduced in unstimulated cells, rDer p 1 and rDer p 23. On the other hand, IL-5 was not statistically different among the basal levels produced within the tested stimuli. All cytokines in the rDer p 2231 treatment group showed significant and elevated levels in PHA stimuli when compared to the Control Group.

When splenocytes from mice treated with rDer p 2231 had their basal levels compared with basal levels production from the Sham treatment group, the following data were generated. A significant increase in IL-10 for the rDer p 1, rDer p 23, rDer p 2231 stimuli and an increased trend for the rDer p 2 and Dp Extract stimuli was observed. IFN- γ had its basal production significantly increased for all parental allergens, Dp Extract and tendency to increase for rDer p 2231. On the other hand, IL-4 had its basal production significantly reduced in unstimulated cells, stimulated with Dp Extract, rDer p 2231 and parental allergens. IL-5 had a significant reduction in its production for stimuli with Dp Extract, rDer p 2231 and parental allergens. All cytokines in the rDer p 2231 treatment group showed significant and elevated levels in PHA stimuli when compared to the Sham treatment grupo.

3.5 The lung tissue of mice treated with rDer p 2231 in a chronic model of allergy, presented a decrease in morphological changes caused by chronic inflammation

Figures 4 and 5 show histological sections of lungs from mice sensitized and challenged repeatedly with *D. pteronyssinus* extract, which clearly induced subepithelial fibrosis, peribronchial smooth muscle hyperplasia, increase in the number of mucus-producing goblet cells and collagen fibers. Those pathological changes were especially observed in the Sham group when compared to mites of the control group, showing effector responses with lung tissue remodeling bias when stimulated by *D. pteronyssinus*. These histopathological inflammatory changes were reduced after treatment with rDer p 2231, as detailed below.

Figure 4A shows that treatment with rDer p 2231 reduced inflammatory cell infiltration and mononuclear cells around the submucosa and in the lung adventitia when compared to representative images of the Sham group. The Sham group, on the other hand, qualitatively showed an increase in these infiltrates and mononuclear cells when compared to the Control group, staining performed by Hematoxylin and Eosin. Figure 4B, on the other hand, shows a decrease in the number of goblet cells in the bronchial epithelium of mice treated with rDer p 2231, when compared to the animals of the Sham group. This reduction was significant when applied to a 5-point scoring system used to determine the goblet cell index (Fig. 4D), which assesses mucus overproduction. The

animals in the Sham group showed a significant increase in the goblet cell index compared to the Control group. Under normal conditions, mice express a limited number of goblet cells in the lungs, as shown by the animals in the Control group (Fig. 4B) in PAS staining. Treatment with rDer p 2231 was also able to markedly reduce subepithelial fibrosis and peribronchial smooth muscle hyperplasia, as shown in the representative image Fig. 4C. These findings were confirmed by the quantitative method, evaluated by Masson's Trichrome stain, showing that the animals in the group treated with rDer p 2231, when compared to the animals in the Sham group, displayed significant reduction in subepithelial fibrosis (Fig. 4E) and peribronchial smooth muscle hyperplasia (Fig. F). On the other hand, the group of animals from the Sham group showed a significant increase in subepithelial fibrosis and smooth muscle hyperplasia compared to the control group.

To evaluate the dysplasia in the elastic fibers, the slides were stained with Weigert's resorcin-fuchsin, showing that the group treated with rDer p 2231 had a noticeably lower degree of dysplasia in these fibers than the animals in the Sham group, as shown in the representative images of Figure 5A. Figure 5B shows the staining of tissue with Picrosirius Red, and Figure 5C displays the results for polarizing microscopy. As it can be observed, both are powerful tools for analyzing collagenic fibers, considering the finding of a reduced number of such fibers in rDer p 2231-treated group in comparison to the Sham group.

4 DISCUSSION

Between murine allergic asthma models, the chronic model demonstrates pathological features more similar to those of human asthma than the acute model (Lee et al., 2016). However, to date, there is a lack of studies investigating the action of hypoallergens in chronic models of allergy and how it acts in the process of chronic airway remodeling. Our study is original in using a model of HDM-induced chronic asthma and treating it with a hypoallergen. Several researchers use repeated airway exposure to ovalbumin (OVA) to establish chronic exposure (Kang et al., 2016; Kumar et al., 2008; Lee et al., 2016; Shinagawa and Kojima, 2003). However, OVA is rarely implicated in human asthma, and other groups have used alternative allergens that may have greater clinical relevance, such as HDMs (Ahn et al., 2007; Johnson et al., 2004; Piyadasa et al., 2016; Ulrich et al., 2008). In addition, chronic exposure to allergens, with antigens from model proteins such as OVA, can lead to the development of tolerance, downregulation of inflammation and airway hyperresponsiveness (Kumar et al., 2008; Swirski et al., 2006). Since HDMs are important sources of indoor allergens and are significantly linked to atopic asthma in

humans, they may lead to a better understanding of inflammation and airway remodeling and provide data to improve the evaluation of new therapies (Ulrich et al., 2008).

Herein, we used a murine model of chronic allergy induced by *D. pteronyssinus* and we were able to follow the kinetics of allergic inflammation, by increasing the serum levels of the sIgE response to Dp Extract and parental allergens of rDer p 2231, in the sera of the animals in different protocol steps.

Our results are in agreement with the immune response observed in human disease, (Schulman and Pohlig, 2015), and in acute (da Silva et al., 2020a) and chronic allergy protocols (Ahn et al., 2007), whose elevated levels of total and/or specific IgE were correlated with allergic and chronic asthma. Following treatment with rDer p 2231, we also observed the kinetics in the levels of IgG1 and IgG2a against Dp Extract, the hypoallergen itself and the parental allergens. Corroborating findings from studies with the hypoallergens of Bet v 1, used to immunize mice, where an increase in Bet v 1-specific IgG1 and IgG2a were associated with a Th1-skewing effect (Aglas et al., 2020; Wallner et al., 2011). It is already well established within mouse models of HDM-induced allergy, the increase in IgG antibody levels (da Silva et al., 2020a). In previous studies with hypoallergens derived from *D. pteronyssinus*, there have been reports of induction of high titers of IgG antibodies and down-regulation of sIgE following immunization (Banerjee et al., 2014; Branchett et al., 2020; Kulwanich et al., 2019). Also in line with published data, (da Silva et al., 2020a; Ferreira et al., 2014; Valenta et al., 2016) our *in vivo* study in an acute model of allergy previously showed a tendency to increase IgG antibody titers among the animals in the treatment groups. Now, in a chronic model, we show that rDer p 2231 induces increasing levels of IgG1 antibodies with statistical differences between groups. Additionally, the hypoallergenic hybrid protein displayed the ability to block the human IgE-allergen interaction. We were also able to show, through the avidity index, that although the reduction in IgE for Dp extract was not so expressive, the strength of interaction between this antigen and the antibody is not high. Thus, our results indicate that rDer p 2231 is able to induce an adaptive immune response in mice with the production of IgG and reduction in IgE levels. Thus, it is possible that vaccination with rDer p 2231 will protect individuals against reactions triggered by natural exposure to *D. pteronyssinus*.

In this chronic model of allergy, we comprehensively characterize lung inflammation. Initially, a change in the total number of cells in the BALF of animals treated with rDer p 2231 was observed, as well as the number of eosinophils and neutrophils and an increase in the number of lymphocytes and macrophages. Reduced neutrophil and eosinophil secretion has previously been associated with improvement in allergies, and the increase is often correlated with disease severity and exacerbation. Eosinophils

migrate from the peripheral circulation to inflammatory lesions, where they release mediators that contribute to airway inflammation (Z. Chen et al., 2018; Dullaers et al., 2012). Some studies point out that neutrophilic, rather than eosinophilic, inflammation of the airways has been implicated in severe asthma (Z. Chen et al., 2018; Jungsuwadee et al., 2004). Treatment with the hypoallergen rDer p 2231 also reduced EPO in BALF and lung tissue. EPO, the most abundant cationic protein in toxic granules, when released into target tissue, causes injury and pathogenic effect and is implicitly linked to eosinophilic inflammation (Akar-Ghibril et al., 2020; Choi et al., 2019). Thus, factors that interrupt the reactivity of neutrophils and eosinophils, such as this hypoallergen, represent promising therapeutic targets.

In this model and in the previous model, reduced levels of Th2 cytokines were found in lung tissue, BALF and splenocytes, followed by increased levels of IL-10 and IFN- γ in splenocytes from mice treated with rDer p 2231. Thus, we believe that the observed decrease in Th2 cytokines may be mediated by IL-10 and IFN- γ . However, these data do not make it clear which of these two cytokines has more influence on the downregulation of IL-4 and IL-5. Again, our findings indicate that rDer p 2231 can potentially induce a regulatory and/or Th1-biased immune response (da Silva et al., 2020a; Hofer et al., 2017; Martinez et al., 2018).

Histological changes in the lower airways, such as goblet cell hyperplasia, subepithelial collagen deposition with increased fibrosis, thickening of the basement membrane and smooth muscle proliferation, result in a decline in lung function which are pathological features observed in airway remodeling in the lower airways in human and experimental asthma (Hough et al., 2020; Samitas et al., 2018). In this study, we demonstrated that rDer p 2231 was able to significantly reduce mucus-producing goblet cells, suggesting a decrease in the hyperplasia and hypersecretion of these cells. It is known that excessive mucus productions, blocking the peripheral airways, is an important characteristic of chronic asthma (Galli et al., 2008). One of the main focus of therapeutic approaches is to reduce goblet cell hyperplasia and consequently mucus production (Dong et al., 2021). In this study, there seems to be a correlation between the reduction of IL-4 and the reduction of mucus production in the lungs of animals treated with rDer p 2231. It is already known that IL-4 together with IL-13 induce the production of TGF- β by epithelial cells, causing metaplasia and mucus production through autocrine signaling, all immunopathological features of Th2-mediated inflammation (Santos Serafim Machado et al., 2015). The significant reduction of neutrophils in BALF is another correlation, which could be attributed to the reduction of goblet cell hyperplasia, as well as the reduction of subepithelial fibrosis in animals treated with rDer p 2231, when correlated with the untreated group. Neutrophils produce TGF- β and matrix metalloproteinase

(MMP-9), which are both involved in chronic inflammation, remodeling process associated with asthma (Ahn et al., 2007; Zastrzezynska et al., 2021). Studies indicate that increased levels of MMP-9 in the lungs of asthmatic patients is related to the severity of asthma and the degree of subepithelial fibrosis (Wenzel et al., 2003; Zastrzezynska et al., 2021).

Another correlation seems to exist between the reduction of eosinophils influenced by the reduction of IL-5 in the BALF, lungs and splenocytes of the animals of the group treated with rDer p 2231, with the reduction of several fibrotic syndromes observed in the lower airways of these animals. Since IL-5 is essential in the terminal differentiation, maturation, migration and survival of eosinophils in peripheral tissues (Rosenberg et al., 2013). Evidences suggest that eosinophils may also be involved in the pathophysiology of airway remodeling, characterized by the deposition of collagen fibrils and thickening of the subepithelial basement membrane, which has been associated with an increase in bronchial mucosa eosinophils in severe asthma (Flood-Page et al., 2003). Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation have been associated with several fibrotic syndromes, but the molecular mechanisms by which eosinophils induce fibrotic changes remain unclear (Flood-Page et al., 2003; Nakayama et al., 2017). Studies indicate that eosinophils directly produce non-collagenous extracellular matrix components, and the excessive deposition of these components associated with collagenous components contributes to tissue fibrosis in allergic airways inflammation (Morimoto et al., 2018).

In this study, we also showed that the hypoallergen rDer p 2231 reduced the thickness of the smooth muscles of the airways in the group of animals treated with rDer p 2231. The smooth muscles of the airways have the function of regulating the diameter of the bronchi and the tone airways, in addition to secreting extracellular matrix, cytokines and chemokines under normal conditions. Under pathological conditions, smooth muscle cells proliferate excessively, becoming the main determinant under airways pathologies. Several studies point to the importance of smooth muscle for airways wall remodeling (Kaczmarek et al., 2019; McAlinden et al., 2019). This is the first tissue pathology associated with severe and fatal asthma in humans (Fang et al., 2020). Taken together, these results show that the proposed asthma model is effective in generating an effector response, where there is evident remodeling of the lung tissue with subepithelial fibrosis, peribronchial smooth muscle hyperplasia, an increase in the number of goblet cells that produce mucus and collagen fibers in the animals of the Sham group, showing that the chronic allergy model using *D. pteronyssinus* soluble extract was able to induce chronic asthma and remodeling, mimicking the human disorder.

5 CONCLUSIONS

In conclusion, our results indicate that treatment with the hybrid molecule rDer p 2231 in mice subjected to repeated exposure to *D. pteronyssinus* extract significantly reduced remodeling factors in their airway. Furthermore, in BALF, lung and splenocytes, treatment with rDer p 2231 led to a reduction in the levels of Th2 cytokines and an increase in Th1 and regulatory cytokines. In addition, reductions in neutrophils and eosinophils were also observed in BALF. Thus, this hypoallergen may be described as a strong vaccine candidate, displaying several efficacious features. Such vaccine may be safely used in future clinical trials in asthmatic patients.

6 AUTHOR CONTRIBUTIONS

The authors are grateful for the support of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq, grant 403336/2021-0) as well as the Research Foundation of the State of Bahia (Fapesb), grant BOL0320/2018 and 164990/2020-8. ESS is currently supported by a post-doctoral fellowship from CNPq (grant 164990/2020-8). We also thank teacher Abilio Borghi for the assistance with the English language review.

7 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

8 REFERENCES

- Agache, I., Lau, S., Akdis, C.A., Smolinska, S., Bonini, M., Cavkaytar, O., Flood, B., Gajdanowicz, P., Izuhara, K., Kalayci, O., Mosges, R., Palomares, O., Papadopoulos, N.G., Sokolowska, M., Angier, E., Fernandez-Rivas, M., Pajno, G., Pfaar, O., Roberts, G.C., Ryan, D., Sturm, G.J., van Ree, R., Varga, E.M., van Wijk, R.G., Yepes-Nunez, J.J., Jutel, M., 2019. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: House dust mite-driven allergic asthma. *Allergy* 74, 855-873.
- Aglas, L., Bethanis, A., Chrusciel, P., Stolz, F., Gruen, M., Jaakkola, U.M., Jongejan, L., Yatkin, E., Van Ree, R., 2020. In vivo Induction of Functional Inhibitory IgG Antibodies by a Hypoallergenic Bet v 1 Variant. *Front Immunol* 11, 2118.
- Ahn, J.H., Kim, C.H., Kim, Y.H., Kim, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.K., Kim, K.H., Moon, H.S., Song, J.S., Park, S.H., Kwon, S.S., 2007. Inflammatory and remodeling events in asthma with chronic exposure to house dust mites: a murine model. *Journal of Korean medical science* 22, 1026-1033.
- Akar-Ghibril, N., Casale, T., Custovic, A., Phipatanakul, W., 2020. Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* 8, 429-440.

- Asturias, J.A., Ibarrola, I., Arilla, M.C., Vidal, C., Ferrer, A., Gamboa, P.M., Vinuela, J.E., Sanz, M.L., Andreu, C., Martinez, A., 2009. Engineering of major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2 for allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 39, 1088-1098.
- Banerjee, S., Weber, M., Blatt, K., Swoboda, I., Focke-Tejkl, M., Valent, P., Valenta, R., Vrtala, S., 2014. Conversion of Der p 23, a new major house dust mite allergen, into a hypoallergenic vaccine. *J Immunol* 192, 4867-4875.
- Batard, T., Baron-Bodo, V., Martelet, A., Le Mignon, M., Lemoine, P., Jain, K., Mariano, S., Horiot, S., Chabre, H., Harwanegg, C., Marquette, C.A., Corgier, B.P., Soh, W.T., Satitsuksanoa, P., Jacquet, A., Chew, F.T., Nony, E., Moingeon, P., 2016. Patterns of IgE sensitization in house dust mite-allergic patients: implications for allergen immunotherapy. *Allergy* 71, 220-229.
- Branchett, W.J., Stolting, H., Oliver, R.A., Walker, S.A., Puttur, F., Gregory, L.G., Gabrysova, L., Wilson, M.S., O'Garra, A., Lloyd, C.M., 2020. A T cell-myeloid IL-10 axis regulates pathogenic IFN-gamma-dependent immunity in a mouse model of type 2-low asthma. *J Allergy Clin Immunol* 145, 666-678 e669.
- Brito, L.A., Singh, M., 2011. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. *J Pharm Sci* 100, 34-37.
- Cates, E.C., Fattouh, R., Wattie, J., Inman, M.D., Goncharova, S., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Jordana, M., 2004. Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol* 173, 6384-6392.
- Chen, K.W., Blatt, K., Thomas, W.R., Swoboda, I., Valent, P., Valenta, R., Vrtala, S., 2012. Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. *J Allergy Clin Immunol* 130, 435-443 e434.
- Chen, Z., Bai, F.F., Han, L., Zhu, J., Zheng, T., Zhu, Z., Zhou, L.F., 2018. Targeting Neutrophils in Severe Asthma via Siglec-9. *Int Arch Allergy Immunol* 175, 5-15.
- Choi, Y., Jeon, H., Yang, E.A., Yoon, J.S., Kim, H.H., 2019. Nasal eosinophilia and eosinophil peroxidase in children and adolescents with rhinitis. *Korean J Pediatr* 62, 353-359.
- Couroux, P., Patel, D., Armstrong, K., Larche, M., Hafner, R.P., 2015. Fel d 1-derived synthetic peptide immuno-regulatory epitopes show a long-term treatment effect in cat allergic subjects. *Clin Exp Allergy* 45, 974-981.
- da Silva, E.S., Aglas, L., Pinheiro, C.S., de Andrade Belitardo, E.M.M., Silveira, E.F., Huber, S., Torres, R.T., Wallner, M., Briza, P., Lackner, P., Laimer, J., Pacheco, L.G.C., Cruz, A.A., Alcantara-Neves, N.M., Ferreira, F., 2020a. A hybrid of two major *Blomia tropicalis* allergens as an allergy vaccine candidate. *Clin Exp Allergy* 50, 835-847.
- da Silva, E.S., Aglas, L., Pinheiro, C.S., de Andrade Belitardo, E.M.M., Silveira, E.F., Huber, S., Torres, R.T., Wallner, M., Briza, P., Lackner, P., Laimer, J., Pacheco, L.G.C., Cruz, A.A., Alcantara-Neves, N.M., Ferreira, F., 2020b. A hybrid of two major *Blomia tropicalis* allergens as an allergy vaccine candidate. *Clin Exp Allergy*.
- Davies, D.E., Wicks, J., Powell, R.M., Puddicombe, S.M., Holgate, S.T., 2003. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol* 111, 215-225; quiz 226.
- Dhami, S., Kakourou, A., Asamoah, F., Agache, I., Lau, S., Jutel, M., Muraro, A., Roberts, G., Akdis, C.A., Bonini, M., Cavkaytar, O., Flood, B., Gajdanowicz, P., Izuhara, K., Kalayci, O., Mosges, R., Palomares, O., Pfaar, O., Smolinska, S., Sokolowska, M., Asaria, M., Netuveli, G., Zaman, H., Akhlaq, A., Sheikh, A., 2017. Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. *Allergy* 72, 1825-1848.
- Dong, L., Wang, Y., Zheng, T., Pu, Y., Ma, Y., Qi, X., Zhang, W., Xue, F., Shan, Z., Liu, J., Wang, X., Mao, C., 2021. Hypoxic hUCMSC-derived extracellular vesicles attenuate allergic airway inflammation and airway remodeling in chronic asthma mice. *Stem Cell Res Ther* 12, 4.
- Dullaers, M., De Bruyne, R., Ramadani, F., Gould, H.J., Gevaert, P., Lambrecht, B.N., 2012. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 129, 635-645.
- El-Khouly, F., Lewis, S.A., Pons, L., Burks, A.W., Hourihane, J.O., 2007. IgG and IgE avidity characteristics of peanut allergic individuals. *Pediatr Allergy Immunol* 18, 607-613.

- Ellis, R., Leigh, R., Southam, D., O'Byrne, P.M., Inman, M.D., 2003. Morphometric analysis of mouse airways after chronic allergen challenge. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 83, 1285-1291.
- Fang, L., Sun, Q., Roth, M., 2020. Immunologic and Non-Immunologic Mechanisms Leading to Airway Remodeling in Asthma. *International journal of molecular sciences* 21.
- Ferreira, F., Wolf, M., Wallner, M., 2014. Molecular approach to allergy diagnosis and therapy. *Yonsei Med J* 55, 839-852.
- Flood-Page, P., Menzies-Gow, A., Phipps, S., Ying, S., Wangoo, A., Ludwig, M.S., Barnes, N., Robinson, D., Kay, A.B., 2003. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *The Journal of clinical investigation* 112, 1029-1036.
- Florencio, A.C., de Almeida, R.S., Arantes-Costa, F.M., Saraiva-Romanholo, B.M., Duran, A.F., Sasaki, S.D., Martins, M.A., Lopes, F.D., Tibério, I.F., Leick, E.A., 2019. Effects of the serine protease inhibitor rBmTI-A in an experimental mouse model of chronic allergic pulmonary inflammation. *Scientific reports* 9, 1-13.
- Galli, S.J., Tsai, M., Piliponsky, A.M., 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445-454.
- Globinska, A., Boonpiyathad, T., Satitsuksanoa, P., Kleuskens, M., van de Veen, W., Sokolowska, M., Akdis, M., 2018. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Diverse mechanisms of immune tolerance to allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 121, 306-312.
- Gupta, K., Kumar, S., Das, M., Dwivedi, P.D., 2014. Peptide based immunotherapy: a pivotal tool for allergy treatment. *Int Immunopharmacol* 19, 391-398.
- Heffler, E., Saccheri, F., Bartezaghi, M., Canonica, G.W., 2020. Effectiveness of omalizumab in patients with severe allergic asthma with and without chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a PROXIMA study post hoc analysis. *Clin Transl Allergy* 10, 25.
- Hofer, H., Asam, C., Hauser, M., Nagl, B., Laimer, J., Himly, M., Briza, P., Ebner, C., Lang, R., Hawranek, T., Bohle, B., Lackner, P., Ferreira, F., Wallner, M., 2017. Tackling Bet v 1 and associated food allergies with a single hybrid protein. *J Allergy Clin Immunol* 140, 525-533 e510.
- Hough, K.P., Curtiss, M.L., Blain, T.J., Liu, R.M., Trevor, J., Deshane, J.S., Thannickal, V.J., 2020. Airway Remodeling in Asthma. *Front Med (Lausanne)* 7, 191.
- Hoyne, G.F., O'Hehir, R.E., Wraith, D.C., Thomas, W.R., Lamb, J.R., 1993. Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. *J Exp Med* 178, 1783-1788.
- Huang, H.J., Curin, M., Banerjee, S., Chen, K.W., Garmatiuk, T., Resch-Marat, Y., Carvalho-Queiroz, C., Blatt, K., Gafvelin, G., Gronlund, H., Valent, P., Campana, R., Focke-Tejkl, M., Valenta, R., Vrtala, S., 2019. A hypoallergenic peptide mix containing T cell epitopes of the clinically relevant house dust mite allergens. *Allergy* 74, 2461-2478.
- Johnson, J.R., Wiley, R.E., Fattouh, R., Swirski, F.K., Gajewska, B.U., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Ellis, R., Inman, M.D., Jordana, M., 2004. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 378-385.
- Jungsuwadee, P., Benkovszky, M., Dekan, G., Stingl, G., Epstein, M.M., 2004. Repeated aerosol allergen exposure suppresses inflammation in B-cell-deficient mice with established allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 133, 40-48.
- Kaczmarek, K.A., Clifford, R.L., Knox, A.J., 2019. Epigenetic Changes in Airway Smooth Muscle as a Driver of Airway Inflammation and Remodeling in Asthma. *Chest* 155, 816-824.
- Kang, H.S., Rhee, C.K., Lee, H.Y., Yoon, H.K., Kwon, S.S., Lee, S.Y., 2016. Different anti-remodeling effect of nilotinib and fluticasone in a chronic asthma model. *Korean J Intern Med* 31, 1150-1158.

- Klimek, L., Schendzielorz, P., Pinol, R., Pfaar, O., 2012. Specific subcutaneous immunotherapy with recombinant grass pollen allergens: first randomized dose-ranging safety study. *Clin Exp Allergy* 42, 936-945.
- Kowal, K., Pampuch, A., Siergiejo, G., Siergiejo, Z., Swiebocka, E., Schlachter, C.R., Chruszcz, M., Jacquet, A., 2020. Sensitization to major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens in house dust mite allergic patients from North Eastern Poland developing rhinitis or asthma. *Adv Med Sci* 65, 304-309.
- Kulwanich, B., Thanyaratsrisakul, S., Jirapongsananuruk, O., Hales, B.J., Thomas, W.R., Piboonpocanun, S., 2019. Effects of Ser47-Point Mutation on Conformation Structure and Allergenicity of the Allergen of Der p 2, a Major House Dust Mite Allergen. *Allergy Asthma Immunol Res* 11, 129-142.
- Kumar, R.K., Herbert, C., Foster, P.S., 2008. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets* 9, 485-494.
- Larche, M., 2014. Mechanisms of peptide immunotherapy in allergic airways disease. *Ann Am Thorac Soc* 11 Suppl 5, S292-296.
- Lee, H.Y., Rhee, C.K., Kang, J.Y., Park, C.K., Lee, S.Y., Kwon, S.S., Kim, Y.K., Yoon, H.K., 2016. Effect of intranasal rosiglitazone on airway inflammation and remodeling in a murine model of chronic asthma. *Korean J Intern Med* 31, 89-97.
- Leick-Maldonado, E.A., Kay, F.U., Leonhardt, M.C., Kasahara, D.I., Prado, C.M., Fernandes, F.T., Martins, M.A., Tiberio, I.F., 2004. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* 34, 145-152.
- Mackenzie, K.J., Fitch, P.M., Leech, M.D., Ilchmann, A., Wilson, C., McFarlane, A.J., Howie, S.E., Anderton, S.M., Schwarze, J., 2013. Combination peptide immunotherapy based on T-cell epitope mapping reduces allergen-specific IgE and eosinophilia in allergic airway inflammation. *Immunology* 138, 258-268.
- Malyala, P., Singh, M., 2008. Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *J Pharm Sci* 97, 2041-2044.
- Martinez, D., Cantillo, J.F., Herazo, H., Wortmann, J., Keller, W., Caraballo, L., Puerta, L., 2018. Characterization of a hybrid protein designed with segments of allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Immunol Lett* 196, 103-112.
- McAlinden, K.D., Deshpande, D.A., Ghavami, S., Xenaki, D., Sohal, S.S., Oliver, B.G., Haghi, M., Sharma, P., 2019. Autophagy Activation in Asthma Airways Remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 60, 541-553.
- Morimoto, Y., Hirahara, K., Kiuchi, M., Wada, T., Ichikawa, T., Kanno, T., Okano, M., Kokubo, K., Onodera, A., Sakurai, D., Okamoto, Y., Nakayama, T., 2018. Amphiregulin-Producing Pathogenic Memory T Helper 2 Cells Instruct Eosinophils to Secrete Osteopontin and Facilitate Airway Fibrosis. *Immunity* 49, 134-150 e136.
- Nakayama, T., Hirahara, K., Onodera, A., Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K., Tumes, D.J., Okamoto, Y., 2017. Th2 Cells in Health and Disease. *Annual review of immunology* 35, 53-84.
- Oliveira, T.T., Campos, K.M., Cerqueira-Lima, A.T., Cana Brasil Carneiro, T., da Silva Velozo, E., Ribeiro Melo, I.C., Figueiredo, E.A., de Jesus Oliveira, E., de Vasconcelos, D.F., Pontes-de-Carvalho, L.C., Alcantara-Neves, N.M., Figueiredo, C.A., 2015. Potential therapeutic effect of *Allium cepa* L. and quercetin in a murine model of *Blomia tropicalis* induced asthma. *Daru* 23, 18.
- Pellaton, C., Perrin, Y., Boudousquie, C., Barbier, N., Wassenberg, J., Corradin, G., Thierry, A.C., Audran, R., Reymond, C., Spertini, F., 2013. Novel birch pollen specific immunotherapy formulation based on contiguous overlapping peptides. *Clin Transl Allergy* 3, 17.
- Pfaar, O., Alvaro, M., Cardona, V., Hamelmann, E., Mosges, R., Kleine-Tebbe, J., 2018a. Clinical trials in allergen immunotherapy: current concepts and future needs. *Allergy* 73, 1775-1783.
- Pfaar, O., Lou, H., Zhang, Y., Klimek, L., Zhang, L., 2018b. Recent developments and highlights in allergen immunotherapy. *Allergy* 73, 2274-2289.

- Piyadasa, H., Altieri, A., Basu, S., Schwartz, J., Halayko, A.J., Mookherjee, N., 2016. Biosignature for airway inflammation in a house dust mite-challenged murine model of allergic asthma. *Biol Open* 5, 112-121.
- Posa, D., Perna, S., Resch, Y., Lupinek, C., Panetta, V., Hofmaier, S., Rohrbach, A., Hatzler, L., Grabenhenrich, L., Tsilochristou, O., Chen, K.W., Bauer, C.P., Hoffman, U., Forster, J., Zepp, F., Schuster, A., Wahn, U., Keil, T., Lau, S., Vrtala, S., Valenta, R., Matricardi, P.M., 2017. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. *J Allergy Clin Immunol* 139, 541-549 e548.
- Prickett, S.R., Rolland, J.M., O'Hehir, R.E., 2015. Immunoregulatory T cell epitope peptides: the new frontier in allergy therapy. *Clin Exp Allergy* 45, 1015-1026.
- Prickett, S.R., Voskamp, A.L., Dacumos-Hill, A., Symons, K., Rolland, J.M., O'Hehir, R.E., 2011. Ara h 2 peptides containing dominant CD4+ T-cell epitopes: candidates for a peanut allergy therapeutic. *J Allergy Clin Immunol* 127, 608-615 e601-605.
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., Foster, P.S., 2013. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 13, 9-22.
- Samitas, K., Carter, A., Kariyawasam, H.H., Xanthou, G., 2018. Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: The one airway concept revisited. *Allergy* 73, 993-1002.
- Santos da Silva, E., Marques Ponte, J.C., Barbosa da Silva, M., Silva Pinheiro, C., Carvalho Pacheco, L.G., Ferreira, F., Briza, P., Alcantara-Neves, N.M., 2019. Proteomic Analysis Reveals Allergen Variability among Breeds of the Dust Mite *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol* 180, 159-172.
- Santos Serafim Machado, M., Ferreira Silva, H.B., Rios, R., Pires de Oliveira, A., Vilany Queiroz Carneiro, N., Santos Costa, R., Santos Alves, W., Meneses Souza, F.L., da Silva Velozo, E., Alves de Souza, S., Sarmento Silva, T.M., Silva, M.L., Pontes-de-Carvalho, L.C., Alcantara-Neves, N.M., Figueiredo, C.A., 2015. The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kappab) activation. *BMC Complement Altern Med* 15, 168.
- Schulman, E.S., Pohlig, C., 2015. Rationale for specific allergen testing of patients with asthma in the clinical pulmonary office setting. *Chest* 147, 251-258.
- Shinagawa, K., Kojima, M., 2003. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 959-967.
- Silkoff, P.E., Strambu, I., Laviolette, M., Singh, D., FitzGerald, J.M., Lam, S., Kelsen, S., Eich, A., Ludwig-Sengpiel, A., Hupp, G.C., Backer, V., Porsbjerg, C., Girodet, P.O., Berger, P., Leigh, R., Kline, J.N., Dransfield, M., Calhoun, W., Hussaini, A., Khatri, S., Chanez, P., Susulic, V.S., Barnathan, E.S., Curran, M., Das, A.M., Brodmerkel, C., Baribaud, F., Loza, M.J., 2015. Asthma characteristics and biomarkers from the Airways Disease Endotyping for Personalized Therapeutics (ADEPT) longitudinal profiling study. *Respir Res* 16, 142.
- Silva, E.S.D., Pinheiro, C.S., Pacheco, L.G.C., Alcantara-Neves, N.M., 2020. Dermatophagoides spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? *Expert Opin Ther Pat* 30, 163-177.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Swirski, F.K., D'Sa, A., Kianpour, S., Inman, M.D., Stampfli, M.R., 2006. Prolonged ovalbumin exposure attenuates airway hyperresponsiveness and T cell function in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 141, 130-140.
- Takaiwa, F., 2021. Next-Generation Allergen-Specific Immunotherapy for Japanese Cedar Pollinosis Using Molecular Approaches. *Immunotargets Ther* 10, 213-224.
- Tanaka, H., Masuda, T., Tokuoka, S., Komai, M., Nagao, K., Takahashi, Y., Nagai, H., 2001. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflammation Research* 50, 616-624.

- Ulrich, K., Hincks, J.S., Walsh, R., Wetterstrand, E.M., Fidock, M.D., Sreckovic, S., Lamb, D.J., Douglas, G.J., Yeadon, M., Perros-Huguet, C., Evans, S.M., 2008. Anti-inflammatory modulation of chronic airway inflammation in the murine house dust mite model. *Pulm Pharmacol Ther* 21, 637-647.
- Valenta, R., Campana, R., Focke-Tejkl, M., Niederberger, V., 2016. Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. *J Allergy Clin Immunol* 137, 351-357.
- Valenta, R., Karaulov, A., Niederberger, V., Zhernov, Y., Elisyutina, O., Campana, R., Focke-Tejkl, M., Curin, M., Namazova-Baranova, L., Wang, J.Y., Pawankar, R., Khaitov, M., 2018. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? *The journal of allergy and clinical immunology. In practice* 6, 1845-1855 e1842.
- Virchow, J.C., 2019. Allergen immunotherapy (AIT) in asthma. *Semin Immunol* 46, 101334.
- Wallner, M., Hauser, M., Himly, M., Zaborsky, N., Mutschlechner, S., Harrer, A., Asam, C., Pichler, U., van Ree, R., Briza, P., Thalhamer, J., Bohle, B., Achatz, G., Ferreira, F., 2011. Reshaping the Bet v 1 fold modulates T(H) polarization. *J Allergy Clin Immunol* 127, 1571-1578 e1579.
- Wenzel, S.E., Balzar, S., Cundall, M., Chu, H.W., 2003. Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J Allergy Clin Immunol* 111, 1345-1352.
- Zastrzezynska, W., Bazan-Socha, S., Przybyszowski, M., Gawlewicz-Mroccka, A., Jakiela, B., Plutecka, H., Zareba, L., Musial, J., Okon, K., Sladek, K., Soja, J., 2021. Effect of omalizumab on bronchoalveolar lavage matrix metalloproteinases in severe allergic asthma. *J Asthma*, 1-8.
- Zhao, B.B., Diao, J.D., Liu, Z.M., Li, C.P., Jiang, Y.X., 2014. Generation of a chimeric dust mite hypoallergen using DNA shuffling for application in allergen-specific immunotherapy. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 3608-3619.
- Zheng, P., Bian, X., Zhai, Y., Li, C., Li, N., Hao, C., Huang, H., Luo, W., Huang, Z., Liao, C., Xue, M., Guo, M.Q., Sun, B., Wu, J.L., 2021. Metabolomics reveals a correlation between hydroxyeicosatetraenoic acids and allergic asthma: Evidence from three years' immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol* 32, 1654-1662.

Figure Legends

Figure 01. *In vivo* responses of hypoallergenic hybrid rDer p 2231. A: Schematic representation of the therapeutic model of chronic allergy in mice. **B:** Specific IgE for IgG1, IgG2a and Dp Extract. **C:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 2231. **D:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 1. **E:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 2. **F:** IgG1, IgG2a and IgE specific for rDer p 23. **G:** Heat map of the proportion of antibodies in the serum. **H:** Percent inhibition of human serum IgE binding to Dp Extract and the parental allergens of rDer p 2231. **I:** IgE avidity index. # - Comparisons with the negative control group; * - Comparisons with the positive control group; & - Comparisons with the dexamethasone-treated group. The number of symbols represents the degree of significance when ANOVA with Tukey's post-test or Kruskal-Wallis with Dunn's post-test were used, depending on the data distribution. One symbol, $P < 0.05$; two symbols $P < 0.01$; three symbols $P < 0.0001$; and four $P < 0.00001$ symbols.

Figure 02. Effect of hypoallergenic protein on cellular inflammation and eosinophil peroxidase activity. Total (A) and differential (B) cell counts. C: Heat map analysis of the inflammatory cells ratio. D: EPO activity in BALF and lungs. One-way ANOVA with Tukey or Dunn post-tests were used to verify statistical differences. # Control comparisons, * Sham treatment comparisons. #, *, & -P <.05; ##, **, && -P <.01; ###, ***, &&& -P <0.0001.

Figure 03. Influence of rDer p 2231 on cytokines levels in BALF, lung tissue and cells from the spleen of mice. Samples were analyzed by capture ELISA to measure IL-4, IL-5, IL-10, and IFN- γ in BALF (A) and lung tissue (B). One-way ANOVA with posttests of Tukey or Dunn were used to verify statistical differences. #Comparisons with Control group. *Comparisons with Sham treated group. §Comparisons with dexamethasone treated group. #, *, § -P < .05; ##, **, §§ -P < .01; ###, ***, §§§ -P < .0001. Supernatants of splenocytes' cultures were collected for the measurements of IL-10(C), IFN- γ (D), IL-4 (E), and IL-5(F). Supernatants of splenocytes' cultures were collected for the measurements of IL-10(C), IFN- γ (D), IL-4 (E), and IL-5(F). One-way ANOVA with posttests of Tukey or Dunn were used to verify statistical differences. *comparison with unstimulated cells within the group itself. #Comparison with estimated cells of the Control group. ^ΔComparison with estimated cells of the Sham group. #, *, Δ -P < .05; ##, **, ΔΔ -P < .01; ###, ***, ΔΔΔ -P < .0001.

Figure 04.

Representative photomicrographs of histological analysis of mouse lung airway from all experimental groups. H/E staining (A) demonstrates intense peribronchial inflammatory and fibroblasts/myofibroblasts infiltrating in the lamina propria, submucosa and adventitia layers of Sham group. PAS staining (B) exhibited decreased production of mucus inferred by hyperplasia of goblet cells in the bronchus epithelium of rDer p 2231 Group in comparison to Sham Group. Part of contractile elements observed in H/E (A) and Masson's Trichrome (C) staining corresponding to a thick smooth muscle tissue observed only in Sham Group. Subepithelial fibrosis assessed by Masson's Trichrome (C) was considerable reduced in rDer p 2231 Group in comparison to Sham Group. Regions captured for analysis correspond to first generation airway. Magnification 200X.

Figure 05.

Representative photomicrographs of extracellular matrix remodeling in mouse lung airway from all experimental groups. Weigert's Resorcin-Fuchsin staining **(A)** demonstrate reduced elastic fiber content in rDer p 2231 Group in comparison to Sham Group. Collagen remodeling was observed by Picrosirius Red staining in Ordinary **(B)** and Polarized Light Microscope **(C)**. Deposition was notably decreased in rDer p 2231 Group in comparison to Sham Group. Regions captured for analysis correspond to first generation airway. Magnification 200X.

Figure 01

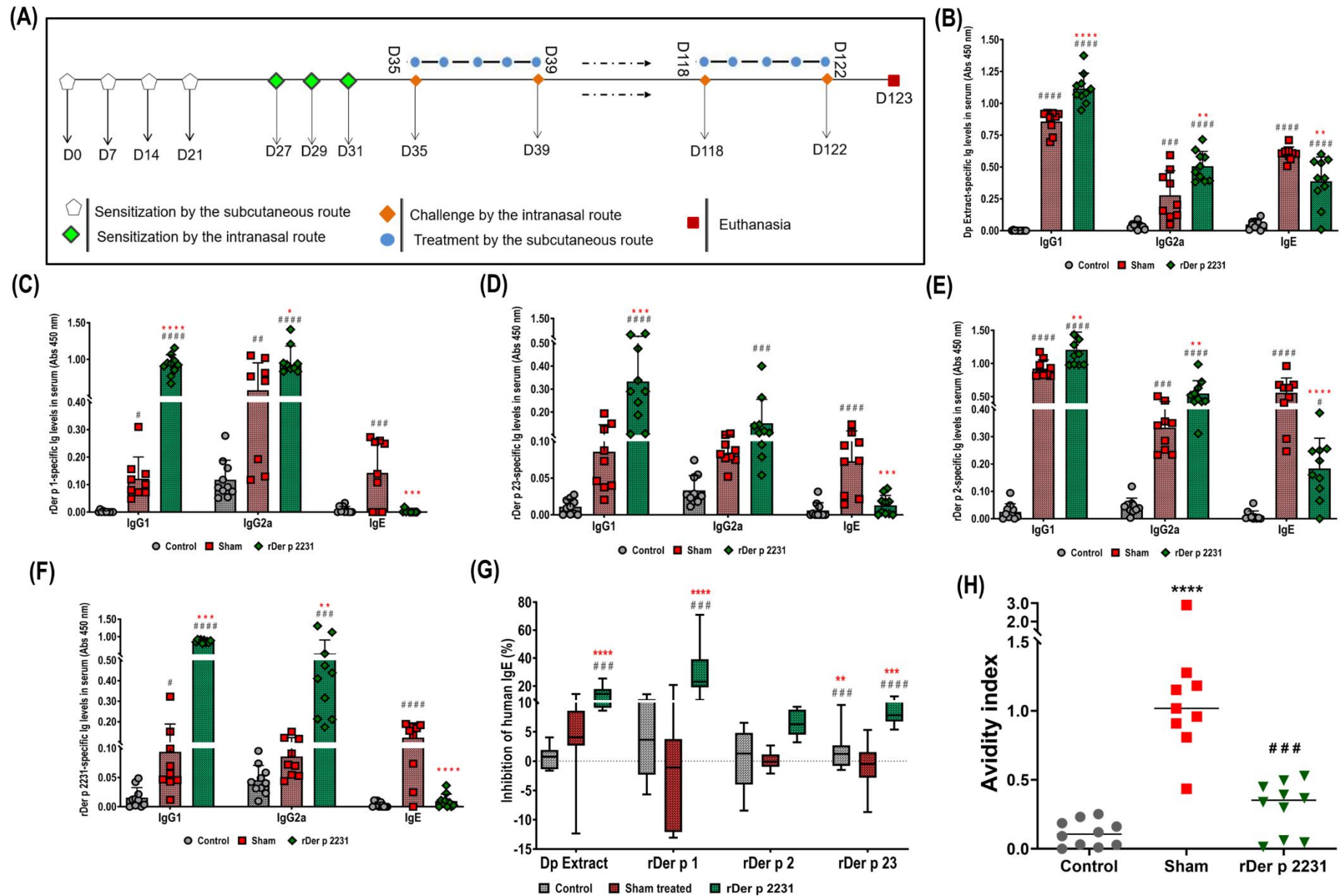


Figure 02

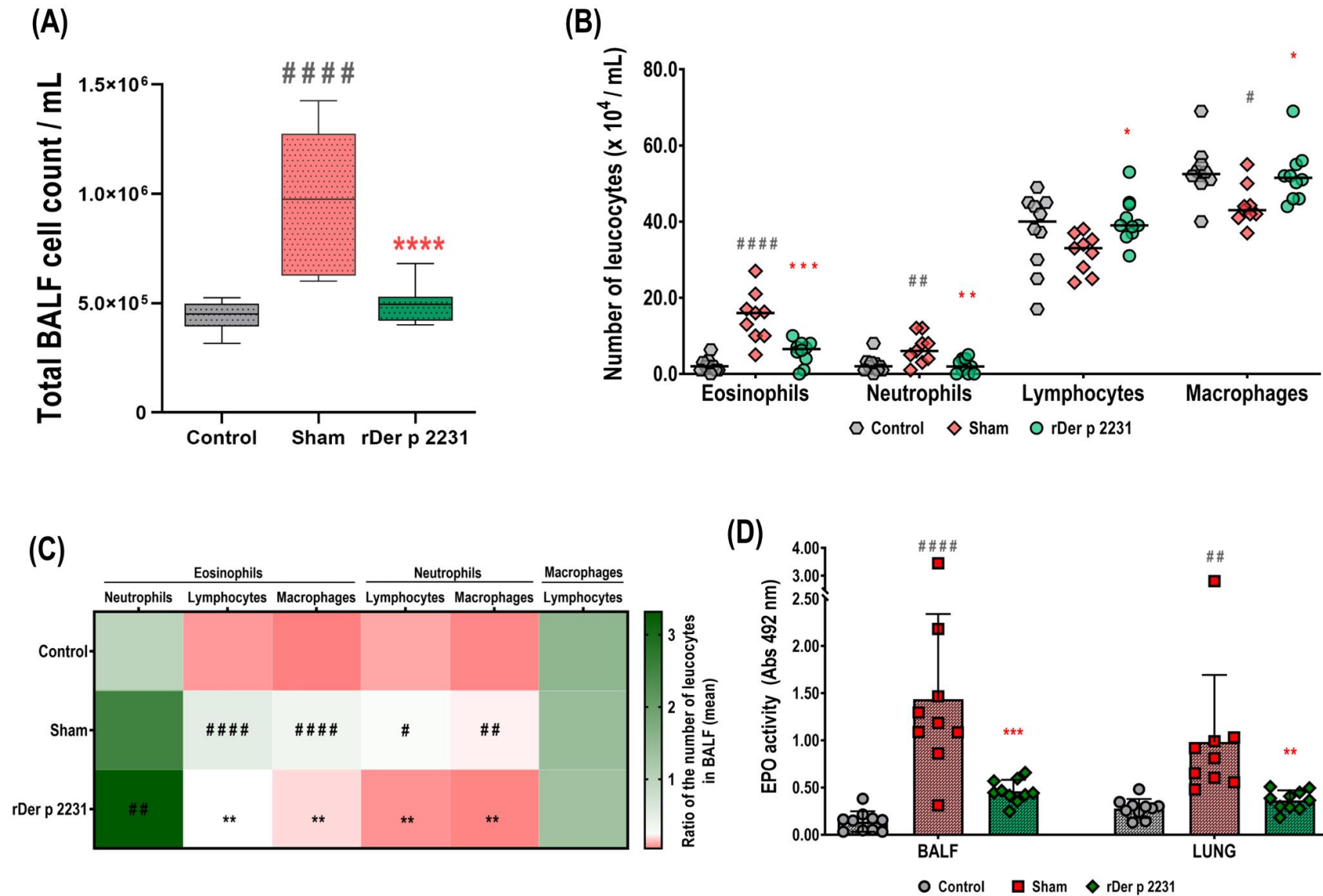


Figure 03

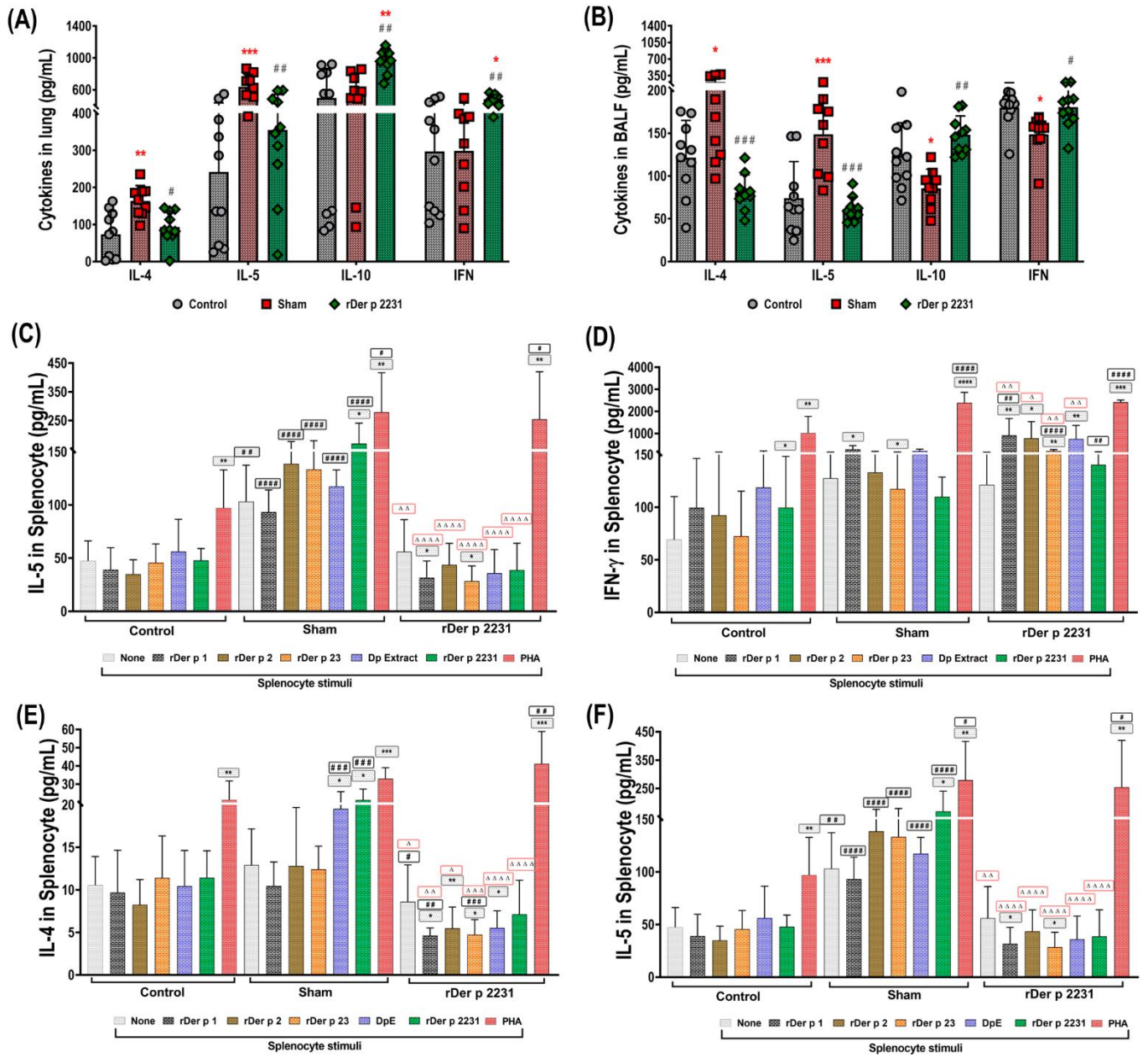


Figure 04

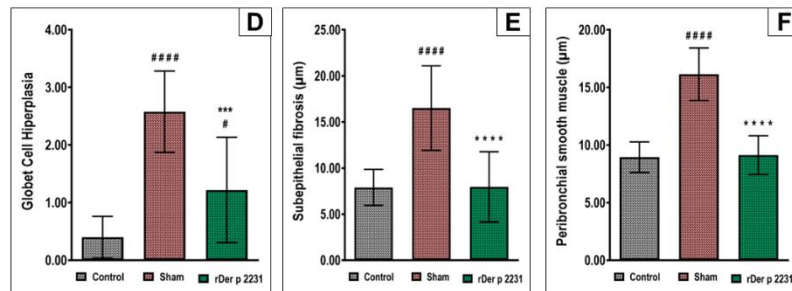
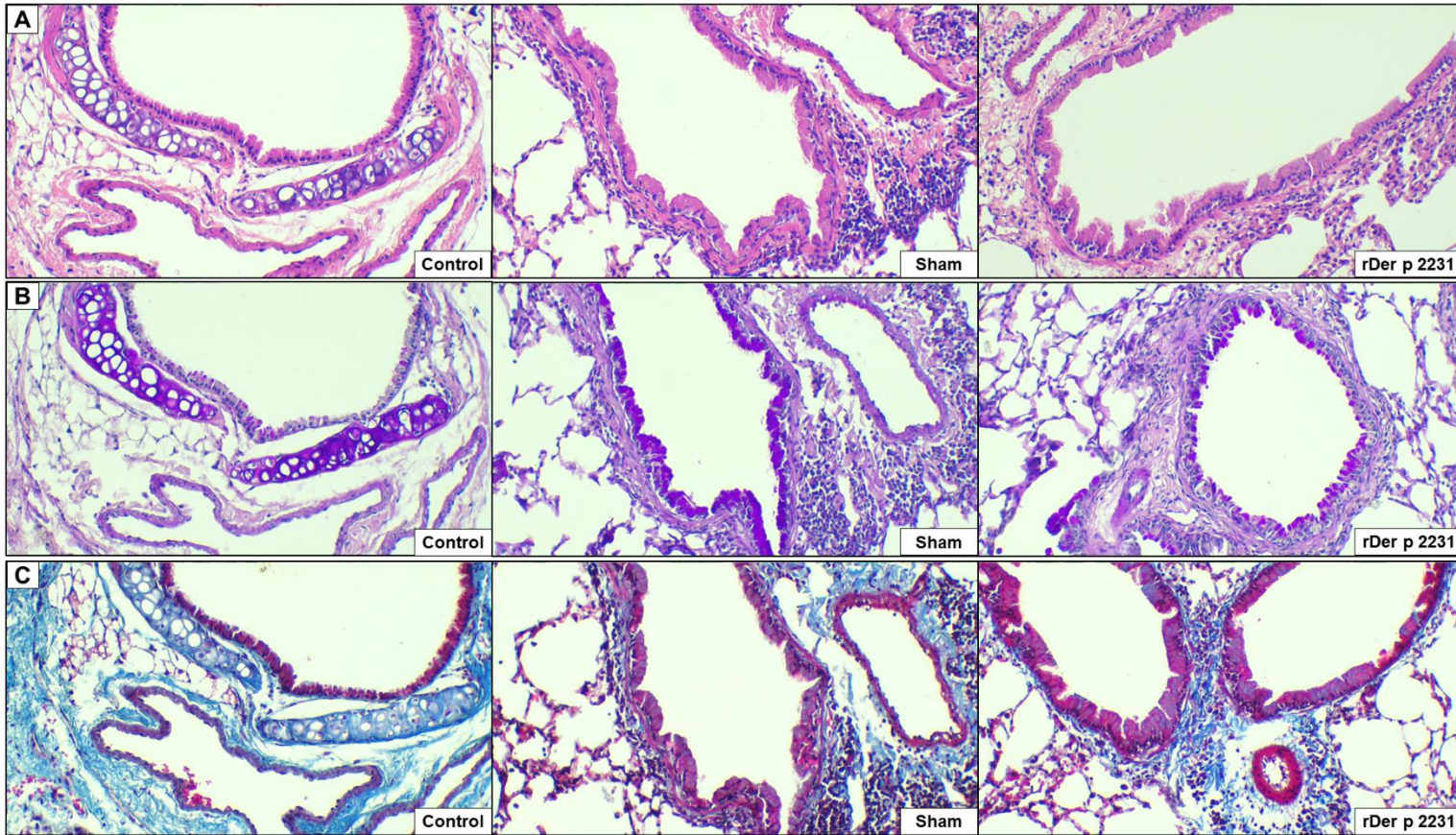
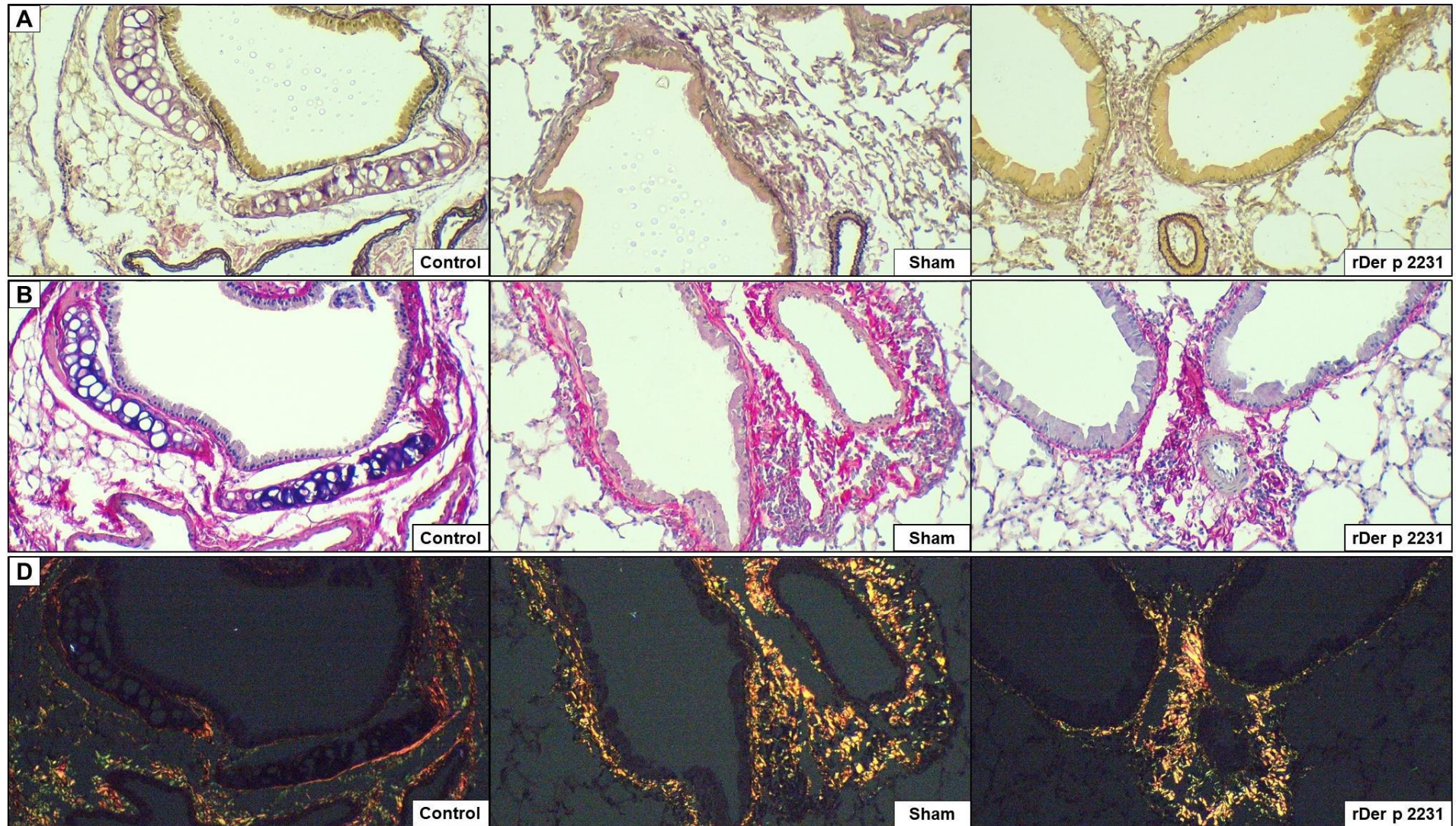


Figure 05

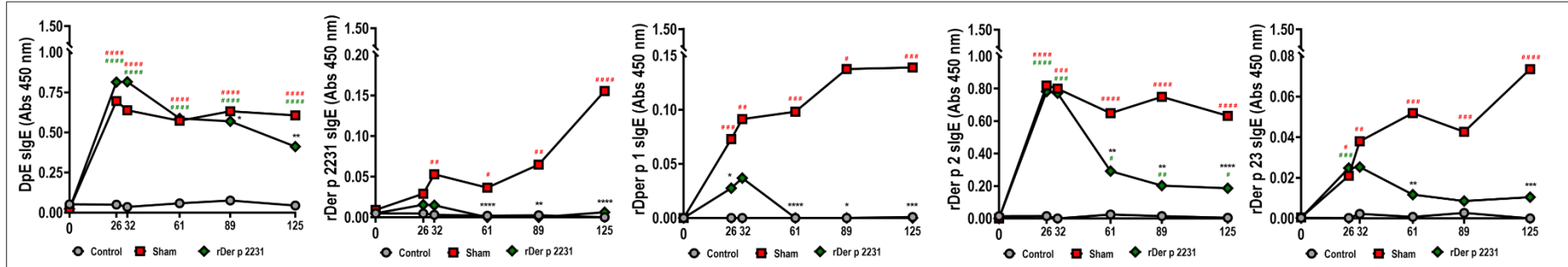


SUPPLEMENTARY

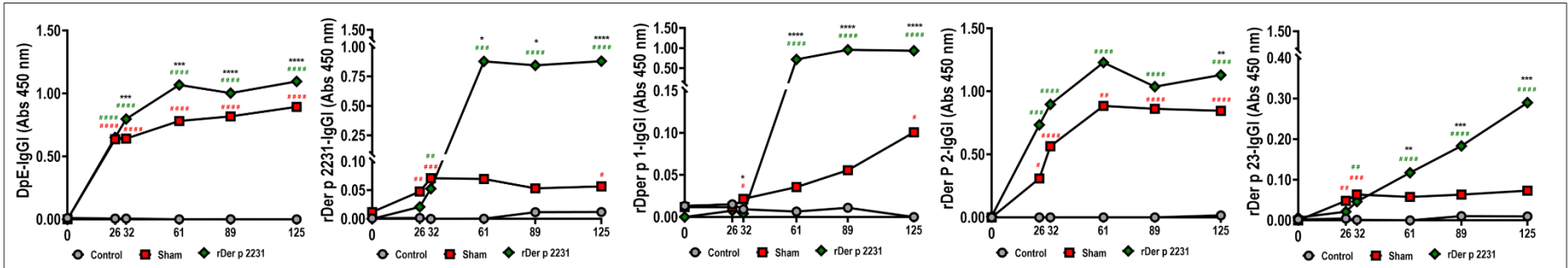
Figure A1. Kinetics of serum levels of specific antibodies to *D. pteronyssinus* in sera from mice submitted to a chronic asthma model and treated with rDer p 2231. (A) sIgE, (B) sIgG1 e (C) sIgG2a anti-Dp Extract e anti alergênos parenteais de rDer p 2231. One-way ANOVA with Tukey or Dunn post-tests were used to verify statistical differences. #Control comparisons (# red in comparison to Sham, # green in comparison to rDer p 2231) *Sham treatment comparisons. #, * -P <.05; ##, ** -P <.01; ###, * -P <0.0001.**

Figure A1

(A)



(B)



(C)

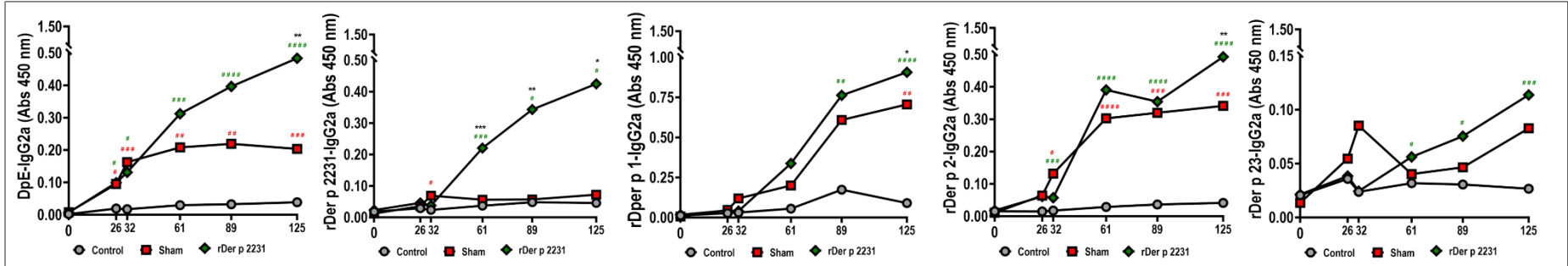


Table 1. *In vivo* model groups

Group	Sensitization (Subcutaneous)	Challenge (Intranasal instillations)	Treatment (Subcutaneous)
Control	PBS + Alum (4 mg/mL)	PBS	PBS
Sham	<i>D. pteronyssinus</i> (100 µg) + Alum (4 mg/mL) + PBS	<i>D. pteronyssinus</i> (10 µg) + PBS	PBS
rDer p 2231	<i>D. pteronyssinus</i> (100 µg) + Alum (4 mg/mL) + PBS	<i>D. pteronyssinus</i> (10 µg) + PBS	rDer p 2231 (25 µg) diluted in PBS

Table A1. Sera and secondary antibodies dilutions

Antigen	Target antibody	Seradilution*	Secondary antibodies dilution#*
	IgG1	1:3200	1:3000
Dp Extract	IgG2a	1:25	1:1000
	IgE	1:5	1:500
	IgG1	1:800	1:3000
rDer p 2231	IgG2a	1:6,25	1:1000
	IgE	1:5	1:500
	IgG1	1:3200	1:3000
rDer p 1	IgG2a	1:6,25	1:1000
	IgE	1:5	1:500
	IgG1	1:3200	1:3000
rDer p 2	IgG2a	1:6,25	1:1000
	IgE	1:5	1:500
	IgG1	1:3200	1:3000
rDer p 23	IgG2a	1:6,25	1:1000
	IgE	1:5	1:500

*Determined by titration curves; #anti-mouse IgE (Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-mouse IgG1 (Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-mouse IgG2a (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Table A2. Responsive characteristics of the subjects included in the study

Donor Number	SPT (<i>D. pteronyssinus</i>) [†]	<i>D. pteronyssinus</i> -specific IgE (kU/L) [‡]	Class
#01	+	24,6	4
#02	+	49,9	4
#03	+	70	5
#04	+	54,2	5
#05	+	70	5
#06	+	100	5
#07	+	100	5
#08	+	100	5
#09	+	55,5	5
#10	+	38,7	4
#11	+	18,2	4
#12	+	1,16	2
#13	+	27	4
#14	+	17,08	3
#15	+	4,86	3
#16	+	77,3	5
#17	+	4,05	3
#18	+	24,5	4
#19	+	43,5	4

† - SPT - skin prick test, *D. pteronyssinus* extracts from Alergotina Produtos Alergênicos Ltd, Rio de Janeiro, RJ, Brazil was used. The test was considered to be positive (+) if the diameter of the weal was at least 3 mm greater than the saline control; ‡ – IgE specific-levels were measured by ImmunoCAP (D1, Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden).

Table A2. Continued

Donor Number	SPT (<i>D. pteronyssinus</i>) [†]	<i>D. pteronyssinus</i> -specific IgE (kU/L) [‡]	Class
#20	+	14,02	3
#21	+	0,85	2
#22	+	6,01	3
#23	+	6,08	3
#24	+	3,02	2
#25	+	5,78	3
#26	+	19,6	4
#27	+	4,14	3

† - SPT - skin prick test, *D. pteronyssinus* extracts from Alergolatina Produtos Alergênicos Ltd, Rio de Janeiro, RJ, Brazil was used. The test was considered to be positive (+) if the diameter of the weal was at least 3 mm greater than the saline control;

‡ – IgE specific-levels were measured by ImmunoCAP (D1, Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden).

CAPÍTULO III

Patente BR 10 2021 008111 2– Submetida ao INPI

Processo de construção e produção de proteína quimérica recombinante hipoalergênica a partir de epítopos de células T dos alérgenos dos grupos 1, 2 e 23 do ácaro Dermatophagoides pteronyssinus, para uso profilático e tratamento de doenças alérgica

RESUMO

Patente de invenção: **“Processo de construção e produção de proteína quimérica recombinante hipoalergênica a partir de epítomos de células T dos alérgenos dos grupos 1, 2 e 23 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, para uso profilático e tratamento de doenças alérgicas”**.

A presente invenção trata-se de um polipeptídeo engenheirado a partir de sequência proteica de regiões antigênicas de epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 do ácaro de poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* para gerar uma molécula hipoalergênica, cujas sequências de aminoácidos e nucleotídeos estão apresentadas em SEQ ID N°.: 1 e SEQ ID N°.: 2, caracterizados por uma redução na reatividade de sIgE em soros de indivíduos alérgicos. Refere-se também aos métodos de produção, purificação e caracterização imunológica dessa molécula. Em modelo *in vivo* foi observado uma diminuição de sIgE e um aumento de sIgG1 e sIgG2a no soro, BAL e no pulmão de camundongos submetidos a um modelo de sensibilização, desafio e tratamento de alergia. Também foi observado uma redução de maneira significativa em comparação com o grupo controle positivo da atividade EPO no BAL e tecido pulmonar. Em modelo *in vitro* no que se refere a quantificação dos níveis de citocinas produzidas a partir da reestimulação de células em culturas de esplenócitos, observou-se uma redução nas respostas de citocinas das células Th2 (IL-4 e IL-5), um aumento de Th1 (INF γ) e Treg (IL-10).

TÍTULO: “Processo de construção e produção de proteína quimérica recombinante hipoalergênica a partir de epítomos de células T dos alérgenos dos grupos 1, 2 e 23 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, para uso profilático e tratamento de doenças alérgica”

Campo de aplicação

[001] A presente invenção refere-se a montagem *in silico* e obtenção de proteínas quiméricas recombinantes hipoalergênicas baseada em epítomos de células T dos três principais alérgenos do ácaro de poeira *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1, Der p 2 e Der p 23), bem como os procedimentos envolvidos na produção destas moléculas e as formulações que as contenham.

[002] A referida invenção é aplicada ao campo da imunoterapia alérgeno-específica (AIT) objetivando o tratamento de doenças alérgicas mediadas por imunoglobulina E (IgE) reativas aos alérgenos de *D. pteronyssinus*, assim como alérgenos de outros ácaros da poeira que apresentem reatividade cruzada de IgE.

[003] Refere-se à construção *in silico* de uma sequência gênica contendo regiões antigênicas de epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 para gerar uma molécula híbrida, com posterior modificações de resíduos de aminoácidos *in silico* a fim de predizer alterações estruturais que modificam o perfil de ligação da IgE, produzindo proteínas quiméricas hipoalergênicas.

Estado da Técnica

[004] Entre as enfermidades imunomediadas, as doenças alérgicas têm apresentado um significativo aumento em sua prevalência e morbidade nas últimas décadas, atingindo proporções epidêmicas (CAMPBELL, D. E. e MEHR, S. Fifty years of allergy: 1965-2015. J Paediatr Child Health, v. 51, n. 1, p. 91-93, 2015; VALERIE et al. The impact of diet on asthma and allergic diseases. Nat Rev Immunol. v. 15, n. 5, p. 308-22, 2015). Destacando-se como um importante problema de saúde pública, sendo incluídas no grupo de doenças crônicas não transmissíveis, podendo afetar 30% a 40% da população mundial, especialmente crianças. Essas doenças geram grandes

impactos socioeconômicos associados a custos diretos e indiretos, sobre os doentes, suas famílias e os serviços de saúde pública (PRESCOTT, S.; ALLEN, K. J. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatric allergy and immunology official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. v. 22, n. 2, p. 155–60, 2011; MORAIS-ALMEIDA, M. et al. Asthma and the Coronavirus Disease 2019 Pandemic: A Literature Review. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 181, n. 9, p. 680-688, 2020). A etiologia das doenças alérgicas do trato respiratório é multifatorial e sua exacerbação está relacionada à predisposição genética, resposta antiviral deficiente, comprometimento da função das células imunológicas, dano no epitélio e resposta de citocinas e quimiocinas (GAVALA, M. L. e GERN, J. E. Virus/allergen interactions in asthma. *Curr Allergy Asthma* v. 13, p. 298-307). A rinite alérgica e a asma alérgica são as enfermidades alérgicas com maior prevalência mundial e estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015 projetaram que aproximadamente 400 milhões de pessoas no mundo são acometidas pela rinite alérgica. Já a asma, afeta 334 milhões de indivíduos a nível global e aproximadamente 20 milhões no Brasil (SOLE, D.; WANDALSEN, G.F.; CAMELO-NUNES, I.C.; NASPITZ, C.K. e ISAAC - Brazilian Group. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3, *J Pediatr (Rio J)*, 82(5), p. 341-6, 2006; PAWANKAR, R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organ J*, v. 7, n. 1, p. 12, 2014).

[005] A asma alérgica é uma doença crônica das vias aéreas, que provoca obstrução do fluxo aéreo associada à inflamação das vias aéreas, induzindo um quadro de hiperreatividade brônquica e, conseqüentemente, episódios recorrentes de sibilância, dispneia, opressão torácica e tosse (HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* v. 18, p. 673–683, 2012; WHEATLEY, L. M., TOGIAS, A. Allergic rhinitis. *N Engl J Med.* v. 372, p.456-63, 2015). É considerada uma doença heterogênea, altamente poligênica com diversas variantes de risco e sob influência de fatores ambientais, destacando-se entre eles os aeroalérgenos, que, após sensibilização, desencadeiam uma resposta inflamatória mediada por IgE (BOWEN, H., KELLY, A., LEE, T., LAVENDER, P. Control of cytokine gene transcription in TH1 and TH2 cells. *Clin. Exp. Allergy*. v. 38, p. 1422–1431, 2008). A região nordeste do

Brasil vem apresentando um aumento significativo no índice de mortalidade por asma (DE SOUZA-MACHADO, C.; SOUZA-MACHADO A. e CRUZ A.A. Asthma mortality inequalities in Brazil: tolerating the unbearable. *ScientificWorldJournal*, 2012, p. 625829, 2012) e estudos mostram o município de Salvador, Bahia, como a cidade com os maiores riscos para sintomas de asma, entre outros 16 grandes centros da América Latina (COOPER, P. J.; RODRIGUES, L. C.; CRUZ, A. A., BARRETO, M.L. Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. *Allergy*, v. 64, n. 1, p. 5-1, 2009).

[006] Em contrapartida, a rinite alérgica é uma patologia inflamatória das vias aéreas superiores, induzida pela exposição a aeroalérgenos, com resposta inflamatória semelhante à da asma. A sintomatologia pode ser classificada em intermitente ou persistente, dependendo da duração. Apesar de apresentar perfil imunológico, epidemiológico e fisiopatológico semelhante à asma, a rinite alérgica distingue-se pelos sintomas clássicos como: obstrução, prurido nasal, rinorréia aquosa, espirros e coceira. Além desses sintomas, os extranasais como prurido ocular e faríngeo também podem estar presentes (BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, G. A (2) LEN and AllerGen Allergy. v. 63, p. 8–160, 2008; BROŽEK, J. L. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: revision. *J Allergy Clin Immunol*. v. 126, p. 466-476, 2010).

[007] Os mecanismos das doenças alérgicas respiratórias são semelhantes, em indivíduos atópicos, apresentando respostas imunes inatas e adaptativas. Os aeroalérgenos passam pelo epitélio nasal e as células epiteliais ativadas liberam CCL2 e CCL20 (quimiocinas que induzem a mobilização de cálcio e a quimiotaxia) que recrutam células dendríticas imaturas. As células dendríticas ativadas migram para os linfonodos de drenagem regional e polarizam as células T imaturas em células Th2. A migração de células dendríticas é iniciada por IL-13 produzida por ILC2s e também por IL-4, produzida principalmente por basófilos. Dentro do centro germinativo do linfonodo, um subconjunto de células Th se diferencia em células T foliculares auxiliares (Tfh). As células Tfh produzem IL-4 e *IL-21*, que, juntamente com a IL-4 derivada de células Th2, promovem a troca de classe de imunoglobulina da cadeia pesada para IgE nas células B (MOHAMED, H., SHAMJI, P. H. D., STEPHEN,

R., DURHAM, M. D. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 140, n. 6, p. 1485-1498, 2017). Indivíduos alérgicos atópicos expressam não apenas citocinas Th2 tradicionais, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, mas também novas citocinas, como IL-25, IL-31 e IL-33. Citocinas epiteliais que favorecem o desenvolvimento de um fenótipo de células dendríticas pró-alérgico, induzem IgE específica para alérgenos, eosinofilia, produção de muco e o recrutamento de células inflamatórias para tecidos inflamados (GUEGUEN, C. et al. Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. v. 137, p. 545-558, 2016; SOYKA, M. B., AKDIS, M., AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergology International*. v. 9, p. 594-600, 2020). Essas citocinas derivadas do epitélio são os principais fatores de crescimento para ILC2s que amplificam e mantêm a inflamação alérgica local controlada por Th2. Durante a exposição subsequente ao alérgeno, o reconhecimento é facilitado por IgE por meio de FcεRI nas células dendríticas e FcεRII nas células B, o qual amplifica o desenvolvimento das respostas Th2 a alérgenos inalados (KOUSER, L et al. Update on biomarkers to monitor clinical efficacy response during and post treatment in allergen immunotherapy. *Curr Treat Options Allergy*. v. 4, p. 43-53, 2017). Uma vez que uma mudança Th2 é estabelecida, o mecanismo das doenças alérgicas consiste em duas fases principais. Na fase inicial ocorre a sensibilização e o desenvolvimento das células de memória. A fase tardia é caracterizada por inflamação e lesão tecidual causada pela ação das células efectoras (FUJITA, H., SOYKA, M. B., AKDIS, M., AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergology International*. v. 9, p. 594-600, 2020). As células dendríticas, dependendo da fase de maturação, da localização, e das citocinas associadas, podem iniciar e manter a inflamação alérgica (DC2s pró-alérgicas) ou promover um estado de tolerância imunológica à sensibilização a alérgenos. Quando as DC2 pró-alérgicas forem expostas a alérgenos e co-cultivados posteriormente com células T, eles promoveram respostas preferenciais aos linfócitos Th2 (PALOMARES, O., AKDIS, FONTECHA, M. M., AKDIS, C. A. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol Ver*. v.278, pp.219-236, 2017).

[008] Os aeroalérgenos são provenientes de diversas fontes ambientais, porém aqui iremos destacar os ácaros da poeira domiciliar. Entre os ácaros da poeira domiciliar, os pertencentes a família Pyroglyphidae são estabelecidos como fonte potencial de alergia, desempenhando um papel significativo em vários distúrbios alérgicos com resposta de hipersensibilidade do tipo I. (PODDER, S., KUMAR, GUPTA, S. G., SAHA, G. K. Incrimination of *Blomia tropicalis* as a Potent Allergen in House Dust and Its Role in Allergic Asthma in Kolkata Metropolis, India. *World Allergy Organ J.* v. 3, n. 5, p.182–187, 2010). O *D. pteronyssinus* é um dos principais piroglífídeos causadores de sensibilização em pacientes alérgicos (CALDERÓN, A. M. et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol.* v. 136. n. 1, P. 38-48, 2015). No sul do Brasil este ácaro representa 72% do total de ácaros presentes em berços e camas (SILVA, D. R. et al. Mites in dust samples from mattress surfaces from single beds or cribs in the south Brazilian city of Londrina. *Pediatr Allergy Immunol.* v. 16, p. 132-6, 2005). Oficialmente, 35 grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p) já foram descritos, caracterizados e organizados em grupos de acordo com as características bioquímicas dos alérgenos (Nomenclatura Alergênica da Organização Mundial da Saúde e da International Union of Immunological Societies (OMS / IUIS; 2019), sendo que desses 14 estão incluídos como alérgenos principais (SILVA, E.S.; PINHEIRO, C.S.; PACHECO, L.G.C. e ALCÂNTARA-NEVES, N.M. Dermatophagoides spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? *Expert Opin Ther Pat*, 30(3), p. 163-177, 2020) Der p 1, Der p 2 e mais recente o Der p 23. Esses alérgenos representam os clinicamente mais importantes, ou seja, essas moléculas possuem alta atividade alergênica, causando respostas de IgE em mais de 50% dos pacientes alérgicos (POSA, D. et al. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. *J Allergy Clin Immunol.* v. 139, p. 541-54, 2017). Nessa perspectiva, uma mistura molecular ou epitópica para imunoterapia alérgeno específica ao *D. pteronyssinus* precisa incluir Der p 1, Der p 2 e Der p 23.

[009] Der p 1 é uma glicoproteína encontrada nas fezes dos ácaros com peso molecular 25 kDa e função bioquímica de cisteína protease (FERNÁNDEZ-CALDAS, E. PUERTA. L. C., CARABALLO, L. C. History of Allergy. *Chem Immunol Allergy.* v. 100, p. 234–242, 2014). Foi demonstrado que a atividade enzimática de Der p 1 parece aumentar seletivamente a resposta de IgE, e que a atividade proteolítica do

Der p 1 condiciona as células T a produzir mais IL-4 e menos interferon- γ (GHAEMMAGHAMI, A. M., ROBINS, A., GOUGH, L. Human T cell subset commitment determined by the intrinsic property of antigen: the proteolytic activity of the major mite allergen Der p 1 conditions T cells to produce more IL-4 and less IFN- γ . Eur J Immunol. v. 31, p. 1211–1216, 2001). O caráter enzimático de Der p 1 e outros alérgenos de ácaros também pode contribuir para sua imunogenicidade aumentando a permeabilidade da mucosa (DEB, R., SHAKIB, F., REID, K., CLARK, H. W. Major house dust mite allergens Der p 1 and Der f 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins-A and -D. Journal of Biological Chemistry. v. 282, p. 36808–36819, 2007).

[010] Der p 2 é uma proteína procedente do corpo do ácaro, com função biológica relacionada com transporte de colesterol, pertence à família NPC2. Além disso, é uma proteína estável ao calor e ao pH, com peso molecular de aproximadamente 15 kDa (Ovsyannikova, I. G., Vailes, L. D., Li, Y., Heymann, P. W., Chapman, M. D. Monoclonal antibodies to group II Dermatophagoides spp allergens: murine immune response, epitope analysis, and development of a twosite ELISA. J Allergy Clin Immunol. v. 94, p. 537–546, 1994; JOHANNESSEN, B. R. et al., Structure of the house dust mite allergen Der f 2: Implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. FEBS Letters. v. 579, p. 1208–1212, 2005). No estágio nativo é expresso como uma proteína de fusão, com uma frequência de 83% de reconhecimento específico de IgE (DEREWENDA, U. et al. The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2, and its biological implications. J Mol. Biol. v. 318 p. 189–197, 2002).

[011] Der p 23 é uma proteína de aproximadamente 8 kDa que mostra homologia com domínios de ligação à quitina e é encontrada principalmente em membranas peritróficas ao redor do pellet fecal. Der p 23 é reconhecido por mais de 70% dos pacientes alérgicos aos ácaros da poeira domiciliar e exibe alta atividade alergênica, conforme determinado por sua capacidade de induzir a ativação de basófilos (WEGHOFER, M. et al: Identification of Der p 23, a peritrophin-like protein, as a new major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen associated with the peritrophic matrix of mite fecal pellets. J Immunol. v.190, p.3059–3067, 2013). Der p 23 é uma peritrofina e já foi relatado que as peritrofinas podem ativar diretamente o sistema imunológico inato 2011. Embora apenas pequenas quantidades de Der p 23 estejam presentes nos pellets fecais e na poeira doméstica, a baixa exposição é suficiente para

sensibilizar pacientes alérgicos e induzir níveis específicos de IgE comparáveis aos principais alérgenos. Além disso, vários pacientes foram sensibilizados apenas para Der p 23, mas não para Der p 1 ou Der p 2, mostrando assim a importância desse alérgeno (MIKA, A. et al. Scabies mite peritrophins are potential targets of human host innate immunity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v. 5, p. 1331, 2011).

[012] As formas atuais de tratamento para alergias respiratórias, baseiam-se principalmente na farmacoterapia visando a redução dos sintomas causados por mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos e basófilos ou células-alvo envolvidas na inflamação alérgica da fase tardia (células T, eosinófilos) (INCORVAIA, C. et al. Current and future applications of the anti-IgE antibody omalizumab. *EBioMedicine.* V. 17, p 16-17, 2017). Além dos anti-histamínicos e corticosteroides, tem-se usado anticorpos monoclonais humanizados, que impedem a ligação da IgE aos seus receptores (BAGNASCO, D. Ferrando M., Varricchi G., Passalacqua G. A critical evaluation of anti-IL-13 and anti-IL-4 strategies in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* v. 170, p. 122–131, 2016). Esses medicamentos suprimem temporariamente os sintomas alérgicos, porém não afetam o curso da doença. Dessa forma, a imunoterapia alérgeno específica é o único tratamento para alergias associadas a IgE, que induz tolerância ao alérgeno, impedindo a progressão dos sintomas da alergia, proporcionando assim um efeito modificador do curso da doença (COX, M. D. The role of allergen immunotherapy in the management of allergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy.* v.30, p.48–53, 2016). Além das manifestações endócrinas e imunossupressoras, dependendo da dose do medicamento utilizada, do períodos prolongado do tratamentos e da gravidade da asma, mesmo que não frequente, estas drogas quando utilizadas em terapia sistêmica podem desencadear reações imunológicas adversas, as quais podem levar o paciente a apresentar manifestações anafiláticas e pseudo-anafiláticas (VENTURA, M. T et al. Alternative glucocorticoids for use in cases of adverse reaction to systemic glucocorticoids: a study on 10 patients. *Br J Dermatol,* v.1, n.48, p. 139-41, 2003).

[013] A Imunoterapia específica para alérgenos, baseia-se na administração de alérgenos causadores de alergia na forma de uma vacina terapêutica, com o objetivo de modificar a resposta imune específica (COX, M. D. The role of allergen immunotherapy in the management of allergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy.* v. 30, p

.48–53, 2016). Os mecanismos de ação da imunoterapia ainda não são totalmente compreendidos, dificultado pelo uso de preparações heterogêneas de alérgenos, diferentes protocolos de tratamento e vias de administração (AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol.* v. 133, p. 621–31, 2014). No entanto, sabe-se que, durante a fase inicial de sensibilização em pacientes com rinite alérgica, a baixa exposição a alérgenos na superfície da mucosa nasal resulta na ativação de células epiteliais. Tais células ativam as células dendríticas, que captam e apresentam antígenos às células T imaturas para induzir respostas alérgicas Th2, apresentação de antígeno esta facilitada por IgE. A exposição subsequente ao alérgeno leva à degranulação de mastócitos e basófilos, causando reações as clássicas da fase inicial. A infiltração subsequente de outros leucócitos leva à inflamação alérgica da fase tardia. Exposição a doses baixas de alérgenos por imunoterapia restaura a função das células dendríticas, que produzem IL-12, IL-27 e IL-10 e promovem o desvio imune de uma resposta Th2 para Th1 e indução de células Treg e Breg (incluindo outros subconjuntos de células B), que induzem a produção de anticorpos IgA e IgG4 bloqueadores (GALLI, S. J. et al. The development of allergic inflammation. *Nature*, v. 454, p. 445-454, 2008).

[014] Quando iniciada precocemente, a imunoterapia alérgeno específica pode prevenir o desenvolvimento da asma em crianças e em adultos com predisposição alérgica (JACOBSEN, L. e VALOVIRTA E. How strong is the evidence that immunotherapy in children prevents the progression of allergy and asthma? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, v. n. 6: p. 556-60, 2007). Especificamente a imunoterapia é geralmente realizada através da administração de doses graduais dos alérgenos ao longo de um período de tempo, que pode variar de 3 a 5 anos, procurando desenvolver uma tolerância imune, enquanto os sintomas da alergia diminuem (AKDIS, C.A. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med*, v. 18, n. 5, p. 736-49, 2012). Apesar das vantagens, o uso da imunoterapia alérgeno específica ainda é limitado, quando comparado à farmacoterapia. A farmacoterapia pode ser amplamente prescrita para pacientes que sofrem de diferentes manifestações alérgicas, ao contrário da imunoterapia, a qual exige que os alérgenos causadores da doença sejam determinados, para prescrição da vacina correta (VALENTA, R., CAMPANA, R., MARTH, K., VAN HAGE, M. Allergen-specific

immunotherapy: from therapeutic vaccines to prophylactic approaches. *J Intern Med.* v. 272, n. 2, p. 144–157, 2012). Outros fatores ainda podem influenciar a eficiência da imunoterapia são (i) baixa qualidade dos extratos naturais de alérgenos usados como imunoterápicos, os quais podem reduzir a eficácia do tratamento, (ii) a administração de extratos alergênicos durante a imunoterapia pode induzir a sensibilização a diferentes alérgenos presentes no extrato, induzindo efeitos colaterais locais, graves e sistêmicos, (iii) a imunoterapia exige horários corretos e profissionais licenciados para as aplicações das doses, além das administrações repetidas, o que leva à baixa adesão do paciente, (iv) os extratos empregados contêm todos os alérgenos com epítopos intactos de células B que são prontamente capazes de se ligar moléculas de IgE específicas na superfície das células efectoras (LARCHE, M., Akdis, C. A., Valenta, R. et al. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* v. 6, p. 761–771, 2006; VALENTA, R., CAMPANA, R., FOCKE-TEJKL, M., NIEDERBERGER, V. Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. *J Allergy Clin Immunol.* v. 137, p. 351–357, 2016).

[015] Através do diagnóstico molecular é possível identificar com precisão os alérgenos responsáveis pela sensibilização, e assim prescrever de forma correta uma imunoterapia alérgeno-específica (KAZEMI-SHIRAZI, L., NIEDERBERGER, V., LINHART, B., LIDHOLM, J., KRAFT D., VALENTA, R. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* v. 127, p. 259–268, 2002). Com base no conhecimento detalhado das sequências proteicas, estruturas secundárias e características imunológicas dos alérgenos, as técnicas de biologia molecular permitem a produção de alérgenos recombinantes bem caracterizados, com atividade biológica conhecida. Além disso, a engenharia genética permite a modificação de alérgenos do tipo selvagem para gerar derivados de alérgenos com reatividade reduzida à IgE (hipoalérgenos), os quais apresentam risco reduzido de desencadear reações alérgicas indesejáveis durante o curso da imunoterapia, além de induzir uma resposta de células T eficiente e imunoprotetora de longa duração (TSCHEPPE, A., BREITENEDER, H. Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* v. 172, n. 4, p. 187–202, 2017). As modificações estruturais nas moléculas de alérgenos para

desestabilizar epítomos de células B, enquanto conservam os epítomos das células T do alérgeno, são realizadas de forma tolerogênica livre de adjuvante, podendo assim evitar reações alérgicas mediadas por IgE (LARCHE, M., Akdis, C. A., Valenta, R. et al. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* v. 6, p. 761–771, 2006). Várias técnicas podem ser empregadas para realização das modificações na estrutura da molécula alergênica com o intuito de torná-la hipoalergênica, dentre essas as mais utilizadas são: fragmentação ou fusão de moléculas, mutações pontuais, formação de quimeras, mosaicos e uso de peptídeos sintéticos curtos e solúveis (TSCHEPPE, A., BREITENEDER, H. Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy. v. 172, n. 4, p. 187–202, 2017; SILVA, E. S. et al. *Dermatophagoides* spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? *Expert Opin Ther Pat*, v. 30, n. 3, p. 163-177, 2020).

[016] As proteínas quiméricas ou híbridas são criadas a partir da conjunção das informações genéticas de pelo menos duas proteínas diferentes. Tais construções podem conter partes ou as proteínas originais completas. As moléculas quiméricas são ideais para a produção de candidatos a vacina para organismos como os ácaros da poeira doméstica, pólen de grama ou veneno de insetos, os quais apresentam vários alérgenos importantes. As proteínas quiméricas podem ser produzidas de forma a aumentar a imunogenicidade, reduzindo o número de moléculas que precisam ser produzidas para serem incluídas em uma formulação vacinal, inclusive reduzindo custos e possíveis problemas de escalonamento para fases de produção industrial das mesmas (LINHART, B., VALENTA, R. Vaccine engineering improved by hybrid technology. *Int Arch Allergy Immunol.* v.134, p.324–331, 2004). Uma proteína híbrida dos três alérgenos principais do veneno de abelha Api m 1, 2 e 3, na qual o autor preservou epítomos de células T, e subtraiu os epítomos de células B de todos os três alérgenos, passou a apresentar uma reatividade de IgE altamente reduzida, e consequentemente baixa capacidade de ligação em mastócitos e basófilos humanos (KARAMLOO, F. et al. Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. *Eur J Immunol.* v. 35, p. 3268–3276, 2005). Em um outro trabalho, autores produziram uma molécula híbrida de Der p 1 e Der p 2, a qual foi capaz de induzir uma resposta reduzida no nível do SPT (do inglês, *Skin Prick Test*), e aumentar à proliferação de células T quando comparadas aos alérgenos naturais (ASTURIAS, J. A. et al. Engineering of major house dust mite

allergens Der p 1 and Der p 2 for allergen-specific immunotherapy. *Exp Allergy*. v.39, p.1088–98, 2009).

[017] **Problemas do estado da técnica**

[018] Diante da importância médica da rinite e asma alérgicas, e os efeitos adversos dos medicamentos paliativos, novas estratégias de prevenção e tratamento para estas enfermidades, fazem-se necessárias. Sabe-se que AIT é o único tratamento curativo disponível para as doenças alérgicas; no entanto, a eficácia do tratamento depende muito da qualidade do produto alergênico aplicado (WALLNER, M.; PICHLER, U., FERREIRA, F. Recombinant allergens for pollen immunotherapy. *Immunotherapy*, v. 5, n. 12, p. 1323–1338, 2013), isso porque, a forma que é feita atualmente, utilizando extrato proteico total, proveniente da extração das proteínas do agente causador da alergia, composto por uma mistura de alérgenos principais e proteínas não alergênicas (AALBERSE, R.C. e CRAMERI, R. IgE-binding epitopes: a reappraisal. *Allergy*, v. 66, N.10, p. 1261-74, 2011) podem apresentar um potencial sensibilizante baixo, ou desencadear efeitos secundários indesejados mediados pela produção de IgE durante o tratamento (Al, et al. Suppression of dust mite allergy by mucosal delivery of a hypoallergenic derivative in a mouse model. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 99, n. 10, p. 4309-19, 2015).

[019] Uma maneira de aumentar a segurança da AIT seria o uso de alérgenos recombinantes, porém, essa alternativa resolve apenas os problemas relacionados à falta de alérgenos bem definidos dos extratos brutos. As moléculas recombinantes do tipo selvagem ainda apresentam a capacidade de realizar reação cruzada com a IgE pré-existente, podendo provocar efeitos anafiláticos graves e com risco de vida (VRTALA, S. et al. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods*, v. 32, n. 3, p. 313–320, 2004). Com o objetivo de resolver os efeitos indesejáveis e aumentar principalmente a segurança da AIT, passou-se a utilizar ferramentas modernas de engenharia de proteínas associados com ferramentas da imunoinformática, com o propósito de desenvolver moléculas recombinantes hipoalergênicas (VRTALA, S. et al. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods*, v. 32, n. 3, p. 313–320, 2004; THALHAMER, T. et al. Designing hypoallergenic derivatives for allergy treatment by

means of in silico mutation and screening. *J Allergy Clin Immunol*, v. 125, n. 4, p. 926–934, 2010).

[020] Em recente prospecção tecnológica realizadas por nosso grupo, observamos uma busca crescente por substituição da AIT baseadas em extratos alergênicos por AIT utilizando alérgenos recombinantes, com destaque para os derivados recombinantes hipoalergênicos (ALCANTARA-NEVES, N. M., SILVA, E. S., PACHECO, L. G. C., PINHEIRO, C. S. Desenho e produção de proteínas híbridas recombinantes hipoalergênicas construídas a partir de alérgenos dos grupos 5 e 21 de *Blomia tropicalis* para uso profilático e tratamento de doenças alérgicas. INPI. Brasil: Universidade Federal da Bahia 2018), dados corroborados por Silva e colaboradores (SILVA, E. S. et al. *Dermatophagoides* spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? *Expert Opin Ther Pat*, v. 30, n. 3, p. 163-177, 2020) onde os autores fizeram uma busca de patentes e artigos publicados relacionados com a criação de moléculas hipoalergênicas a partir do ácaro *Dermatophagoides* spp. para produção de vacinas. Verificou-se que os alérgenos Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 5, Der p 7, Der p 8, Der p 23, Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der f 7 e Der f 13 já foram utilizados como alvos para construção de vacinas hipoalergênicas.

Vantagens da invenção

[021] Prospecções tecnológicas destacam as diversas vantagens do uso de variantes hipoalergênicas recombinantes de alérgenos, mostrando o avanço de tecnologias mais seguras, eficazes e orientadas para o perfil individual de sensibilização alérgica do paciente. Nas últimas décadas tem se observado o aumento de pedidos de patentes com essa tecnologia, ocupando a quarta posição no número total de pedidos de patentes nesse período. Observa-se também, um aumento no pedido de patentes de proteínas quiméricas (híbridas) principalmente as que preservam sequências de epítomos de células T (SILVA E. S. et al. *Advances in patent applications related to allergen immunotherapy*. *Expert Opin Ther Pat*, v. 26, n. 6, p. 657-68, 2016; SILVA, E. S. et al. *Dermatophagoides* spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? *Expert Opin Ther Pat*, v. 30, n. 3, p. 163-177, 2020).

[022] As construções de proteínas híbridas ou quimeras tem se destacado como uma abordagem inovadora entre os grupos de patentes, pelas seguintes vantagens: (i) simplificação da produção da proteína recombinante, já que uma única molécula será produzida; (ii) uma única molécula contém a informação imunológica relevante de alérgenos maiores de um ou mais organismos; (iii) aumento do potencial imunogênico; e (iv) possibilidade de exclusão ou inclusão de regiões conservadas de alérgenos (SILVA, E. S. et al. *Dermatophagoides* spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? Expert Opin Ther Pat, v. 30. n. 3, p. 163-177, 2020).

[023] Um levantamento feito por SILVA e col. (SILVA et al., *Dermatophagoides* spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? Expert Opin Ther Pat, v. 30, n. 3, p. 163-177, 2020) mostrou que Der p 2 foi o alérgeno mais direcionado para a construção de derivados hipoalergênico ou híbridos, fazendo parte de 8 pedidos de patente e 9 artigos. Der p 1 foi o segundo alérgeno mais presente nos dados analisados fazendo parte de 6 pedidos de patente e 10 artigos, e estava presente apenas nas patentes como segmentos de proteínas híbridas. Der p 23, considerado um alérgeno imunodominante, foi encontrado em uma patente e um artigo relacionado como uma variante hipoalergênica. Os dados levantados, apontando a frequência de estudos feitos com os alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 concordam com os achados de POSA e col. 2017 (POSA, D. et al. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. J Allergy Clin Immunol. v. 139, p. 541-54, 2017), onde os autores apontam esses três alérgenos como as “principais” moléculas alergênicas de *D. pteronyssinus*. Em estudo feito por eles foram analisados os níveis de IgE em soros de 191 pacientes jovens (0-20 anos) e mostrou-se que 77%, 61% e 50% das amostras eram positivas para Der p 2, Der p 1 e Der p 23, respectivamente. A frequência das patentes e artigos publicados estão interinamente relacionados com a importância clínica dos alérgenos em questão.

[024] A patente número WO2016193126A1 e título “Allergy-specific immunotherapy compositions for use in the treatment of house-dust mite allergy” descreve uma composição contendo alérgenos Der p 1 e Der p 2 ou alérgenos Der f 1 e Der f 2 naturais purificados para uso no tratamento de alergias aos ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. No entanto, sabe-se que a imunoterapia com alérgenos naturais podem

provocar efeitos secundários, por isso é recomendado o uso de alérgenos hipoalergênicos, podendo ser desenvolvidos de forma racional utilizando ferramentas de bioinformática e imunoinformática, como é descrito neste pedido de patente.

[025] A patente WO2015100360 A1 e com título “Peptide Combinations and uses thereof in treating dust mite allergy” trata-se da combinação de peptídeos ou variantes dos alérgenos de *Dermatophagoides* spp., Der p 1, Der f 1, Der p 2 e / ou Der f 2. Esses peptídeos compreendem pelo menos um epítopo de célula T. A invenção também se refere ao uso de tais combinações de peptídeos na tentativa de uma resposta imune causada por um ácaro. A mistura desses peptídeos ocorreu de forma aleatória sem nenhum estudo prévio sobre processos de hipoalergenização, diferente da nossa proposta de patente que utiliza estudos *in silico* para testar o potencial da tecnologia desenvolvida.

[026] A patente WO2009118642A2 com título “Hypoallergenic hybrid proteins of major group 1 and 2 mite allergens for use in the treatment of allergies” refere-se a uma composição contendo proteínas híbridas hipoalergênicas compostas por fragmentos de alérgenos Der p 1 e Der p 2. Em um artigo publicado por ASTURIAS, J. A e col. 2009 (ASTURIAS, J. A. et al. Engineering of Major House Dust Mite Allergens Der P 1 and Der P 2 for Allergen-Specific Immunotherapy. *Clinical & Experimental Allergy*, 39, p. 1088-1098, 2009) os autores fizeram uma descrição semelhante, apresentando dados da construção de duas proteínas quiméricas, sendo que uma mostrou quase a mesma reatividade de IgE quando comparado ao alérgeno natural. A segunda quimera descrita, mostrou reatividade reduzida de IgE, mas não foi demonstrado se a imunização com este derivado induziu anticorpos IgG específicos para o alérgeno Der p 1. Por outro lado, nossa proposta mostrou experimentalmente redução significativa da IgE em soros de indivíduos alérgicos. *In vivo* também foi observado também uma diminuição de sIgE e um aumento de sIgG1 e sIgG2a no soro, BAL e no pulmão de camundongos. Também foi observado uma redução da atividade EPO no BAL e tecido pulmonar *in vitro*. Em culturas de esplenócitos foi ainda observado uma redução nas respostas de citocinas das células Th2 (IL-4 e IL-5), um aumento de Th1 (INF γ) e Treg (IL-10). Tais parâmetros são fundamentais na avaliação da eficácia da imunoterapia em humanos.

[027] A patente WO 2012072678 A1, título “Hypoallergenic polypeptides for the treatment of house dust mite allergy” descreve o processo de hipoalergenização pela técnica de fusão de proteínas com objetivo de tratar a alergia causada pelo ácaro da poeira *D. pteronyssinus*. O derivado em questão foi produzido pela fusão de proteína e modificações pontuais usando as técnicas de DNA *shuffling* e mutagênese sítio dirigida. Os inventores geraram um híbrido contendo epítomos de células T dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 de *D. pteronyssinus*, além de reduzida reatividade de IgE e baixa capacidade de ativação de basófilos isolados de pacientes alérgicos. Apesar da grande vantagem do DNA *shuffling* de montar moléculas com potencial anafilático reduzido e imunogenicidade melhorada, ainda existe a necessidade de realizar múltiplos ensaios, para finalmente se obter moléculas candidatas adequadas. No pedido de patente aqui proposto, as moléculas foram selecionadas previamente *in silico*, antes de qualquer experimento de bancada. Apenas as moléculas com os melhores escores preditivos foram escolhidas para expressão heteróloga, reduzindo assim o número de etapas experimentais para a obtenção das moléculas híbridas hipoalergenizadas. Além disso, a molécula desse pedido de patente contém não só epítomos de células T dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 mas também do Der p 23, incluindo dessa forma os três alérgenos maiores do *D. pteronyssinus* em uma única formulação.

[028] A patente US 2015050301 A1 com título “Contiguous overlapping peptides for treating house dust mite allergy” descreve o processo de hipoalergenização pela técnica de peptídeos contíguos sobrepostos (COPs) para o tratamento de pacientes alérgicos, fornecendo uma composição contendo epítomos de células T potenciais para Der p 1 e Der p 2 a partir de sequência originais do alérgeno. Esses peptídeos são desprovidos da estrutura tridimensional do alérgeno original, reduzindo, portanto, sua capacidade de ligar-se a IgE. Embora a técnica do COPs consiga fornecer todos os epítomos de células T potenciais para um determinado alérgeno, com baixa capacidade de ligação a IgE, existe ainda a necessidade de realização de ensaios de bancada como por exemplo o de resposta anafilática para testar o comportamento da sobreposição dos peptídeos gerados, para finalmente definir as moléculas candidatas adequadas. No pedido de patente aqui proposto, as moléculas foram selecionadas previamente *in silico*, reduzindo assim tais etapas experimentais. Na patente US 2015050301 também não foi demonstrado experimentalmente se as moléculas

geradas conseguiram induzir o perfil de resposta regulatória e/ou Th1, uma vez que apenas os dados da hipoalergenização foram apresentados. Diferentemente do pedido de patente por nós proposto, onde os dados indicam a indução de tais perfis imunes.

Definições

[029] O termo “**alérgeno**” refere-se a um antígeno que suscita reações de hipersensibilidade imediata. A maioria dos alérgenos são proteínas ambientais comuns, produtos de origem animal ou produtos químicos. Em pacientes alérgicos, a presença do alérgeno induz a produção aumentada da IgE, cuja posterior ligação às células efetoras e segunda exposição ao alérgeno, conduz a liberação de mediadores inflamatórios e conseqüente manifestações clínicas.

[030] O termo “**hipoalergênico**” significa pouco alergênico, e tal como aqui utilizado define-se por sua diminuída reatividade de IgE, e conseqüentemente não ativa células efetoras de reação de hipersensibilidade tipo I, mas retém capacidade imunogênica induzindo a proliferação de células Th1 e T regulatórias.

[031] O termo “**híbrido**” ou “**quimera**” diz respeito a fusão de regiões de interesse de duas ou mais proteínas, dentro de uma mesma espécie ou organismos diferentes, seja por técnicas *in silico* ou por técnicas experimentais de sobreposição de regiões.

[032] O termo “**mutação**” é a alteração permanente da sequência nucleotídica de um elemento genético de um organismo. Na presente aplicação de patente, refere-se a modificações pontuais em um ou mais códons que codificam resíduos de aminoácidos. Tais substituições causam alterações estruturais na nova molécula, que será expressa, produzindo uma molécula hipoalergênica.

[033] O termo “**valor p**” é a probabilidade de um modelo previsto ser pior ou melhor em um conjunto de modelos gerados aleatoriamente para essa proteína (ou domínio), portanto, o valor-p avalia a qualidade relativa de um modelo. Quanto menor o valor do p, maior será a qualidade do modelo.

[034] O termo “**uGDT**” representa a pontuação do teste de distância global não normalizada e mede a qualidade absoluta do modelo. Se um modelo tiver uGDT bom (> 50), mas GDT ruim (<50), isso indica que apenas uma pequena parte do modelo pode ser boa.

Sumário da invenção

[035] Considerando todos os dados relatados, este pedido de patente refere-se à construção *in silico* de um gene sintético que irá codificar uma proteína recombinante quimérica hipoalergênica combinando sequências proteicas de regiões antigênicas de epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23. Além da inclusão de ligantes usados para separar os peptídeos entre os diferentes alérgenos ou para ligar peptídeos do mesmo alérgeno, a fim de predizer estruturas que mantenham a capacidade imunogênica e sem perfil de ligação a IgE. Após análise e síntese gênica foi possível realizar a expressão de uma proteína quimérica hipoalergênica contendo epítomos de células T imunodominantes dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 do ácaro *D. pteronyssinus*. Essa proteína foi chamada de Der p 2231. Os dados aqui apresentados através da análise das características bioquímicas e imunológicas da proteína Derp 2231 podem tornar o processo de imunoterapia mais seguro, eficaz e orientado para o perfil individual de sensibilização alérgica do paciente.

Descrição detalhada da tecnologia

Desenho *in silico* da proteína quimérica hipoalergênica

[036] A presente invenção refere-se à construção *in silico* de um gene sintético que irá expressar uma proteína quimérica hipoalergênica de regiões antigênicas de epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23. A proteína é constituída por quatro peptídeos de Der p 1, quatro peptídeos de Der p 2 e um peptídeo de Der p 23, além dos ligantes usados para separar os peptídeos entre os diferentes alérgenos ou para ligar peptídeos do mesmo alérgeno. A caracterização funcional da molécula gerada foi avaliada com base no arranjo de posições dos peptídeos dos alérgenos. As estruturas terciárias desses diferentes arranjos foram

preditas e a melhor estrutura proteica modelada foi escolhida. Detalhadamente, o processo compreende os passos a seguir:

[037] A recuperação das sequências peptídicas foi feita a partir de estudos publicados por Hinz e col. 2016 (HINZ, D. et al. Definition of a pool of epitopes that recapitulates the t cell reactivity against major house dust mite allergens. Clin Exp Allergy. v.45, n.10, p.1601–1612, 2015), onde o grupo definiu um total de 137 epítomos imunodominantes de células T específicas para ácaro *da poeira doméstica*. Desses, foram selecionados nove peptídeos de epítomos de células T específicos para o ácaro *D. pteronyssinus*, quatro peptídeos eram de epítomos de células T específicos para Der p 1, quatro para Der p 2 e um para o Der p 23.

[038] A molécula gerada foi projetada combinando epítomos de células T com vinculadores/ligantes usados para a separação eficaz de cada epítomo. Um total de 2 ligantes EAAAK, 6 ligantes KK foram usados. Esses ligantes, além do papel de conexão, impedem a geração de epítomos juncionais (neo-epítomos), preocupação importante em projetos de construção de sequências peptídicas constituídas por epítomos, melhorando, portanto, o rendimento da expressão e atividade biológica, além de auxiliar na obtenção de perfis farmacocinéticos desejáveis (CHEN, X., ZARO, J. L., SHEN, W. Fusion protein linkers: property, design and functionality, Adv. Drug Deliv. Rev. v.65, n.10, p.1357–1369, 2013).

[039] Para determinar uma melhor caracterização funcional da proteína quimérica *in silico*, foram feitas seis diferentes modificações em relação a posição dos peptídeos dos alérgenos. As estruturas terciárias dessas diferentes modificações foram modeladas usando o servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/prever/>). O melhor modelo foi escolhido com base na quantidade de domínios funcionais, este demonstrou a melhor estrutura proteica modelada, uma vez que a saída do servidor apresentou 100% de resíduos modelados em formato tridimensional, com três domínios funcionais. A partir deste ponto a proteína quimérica gerada será sempre referida como rDer p 2231.

Desenho e síntese das sequências de nucleotídeos harmonizadas da proteína quimérica hipoalergênica

[040] A harmonização de códons foi realizada para recodificação das sequências do híbrido, buscando uma expressão ótima em *E. coli*. Nesse sentido, as frequências de utilização de códons do hospedeiro de expressão (*E. coli*) foram estreitamente alinhadas às frequências de utilização de códons do hospedeiro dos genes-alvo (*D. pteronyssinus*). Para tal, tabelas de utilização de códons espécie-específicas do Kazusa DNA Res Inst foram utilizadas (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). As sequências harmonizadas dos híbridos foram sintetizadas pela empresa FASTBIO (Campus USP Ribeirão Preto, SP) e clonadas no vetor de expressão pET21a(+).

Exemplos de utilização

[041] Os exemplos seguintes são apresentados para demonstrar o potencial inovador da aplicação da invenção, para que possa ser melhor compreendido e não devem ser interpretados como limitações das reivindicações feitas nesta patente. Uma variedade de outros tipos de sistemas de expressão heterólogos estão disponíveis podendo ser usadas para produção das proteínas híbridas hipoalergênicas, como sistemas *cell-free* e sistemas eucarióticos. A purificação desses híbridos, inclusive, pode ser ajustada com diversas modalidades de cromatografia e o modo de obtê-los também pode ser alterado.

Exemplo 1: Análises in silico das sequências da proteína quimérica hipoalergênica

[042] Foram projetados 6 híbridos, construídos a partir de modificações em relação a posição dos peptídeos dos diferentes alérgenos. Os híbridos foram nomeados como rDer p 1223, rDer p 2312, rDer p 1232, rDer p 2123, rDer p 2231 e rDer p 2321. Os peptídeos dos epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 foram obtidos através de revisão da literatura (HINZ, D. et al. Definition of a pool of epitopes that recapitulates the t cell reactivity against major house dust mite allergens. Clin Exp Allergy. v. 45, n. 10, p. 1601–1612, 2015). A imunogenicidade dos híbridos geradas foi confirmada através de predição de ligação de MHC-II usando *IEDB analysis resource Consensus tool* (<https://www.iedb.org/>). As estruturas terciárias das diferentes modificações foram modeladas usando o servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/prever/>), o melhor modelo foi

escolhido com base na quantidade de domínios funcionais, valor-P e uGDT (GDT) gerado. Para ilustração final foram geradas 6 modelos (**Figura 1A-F**). Para fins de registro apenas os resultados referentes a construção rDer p 2231 (**Figura 1E**) serão incluídos nessa patente. Portanto, a partir disso, a sequência de aminoácidos e de nucleotídeos codificadores foram identificadas como SEQ ID N°.: 1 e SEQ ID N°.: 2 foi finalizada.

Exemplo 2: Expressão em pequena escala e avaliação da solubilidade do híbrido hipoalergênico

[043] Os vetores de expressão contendo as sequências harmonizadas foram transformados em *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), incubadas em placas LB-agar (100 µg/mL ampicilina, 34 µg/mL de cloranfenicol). Uma única colônia resistente foi selecionada para expressão proteica, realizada em 5 mL de meio Luria Bertani (LB) (100 µg/mL ampicilina, 34 µg/mL de cloranfenicol). Diferentes parâmetros foram testados, como: variação do tempo (0 a 20 h), temperatura (26°C e 37°C), indução nas densidades ótica do cultivo (O.D₆₀₀) 0,6 – 0,9 com rotação de 200 rpm. A indução da expressão foi feita através da adição de 1 mM de Isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Em seguida, o sedimento bacteriano da cultura foi obtido por centrifugação a 7000 g, 20 minutos, 4 °C e ressuspenso em tampão sódio fosfato (50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄) pH 7.4. O sonicador de sonda (Q55 Qsonica®) foi usado para rompimento celular (25 kHz; 15 segundos). Os passos de sonicação foram repetidos sete vezes com intervalos de 15 segundos, as células foram lisadas em ambiente refrigerado. Todo o conteúdo foi centrifugado por 20 minutos, 4 °C, à 7000 g. O sobrenadante retirado (fração solúvel) e o pellet solubilizado em 25 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 6 M U), pH 7.4. Após solubilização, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, 4° C, à 7000 g, e o sobrenadante coletado (fração insolúvel). O produto final foi filtrado em filtro estéril de 0,22 microns. A avaliação da expressão e da solubilidade foi realizada em SDS-PAGE a 12%. A proteína quimérica rDer p 2231 foi expressa na temperatura de 26 °C, tempo de 6 horas, O.D₆₀₀ 0,6, apresentando peso molecular aproximado de 25 kDa e encontrando-se nos corpos de inclusão sendo portanto insolúvel (**Figura 02**).

Exemplo 3: Purificação do híbrido hipoalergênico

[044] A purificação da proteína recombinante foi realizada através de cromatografia de afinidade automatizada, utilizando uma coluna níquel HisTrap FF Ni Sepharose (GE Healthcare) no equipamento AKTA pure (GE Healthcare, Healthcare, Bio-Sciences AB, Björkgatan 30 751 84 Uppsala, Sweden). A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 2 mM Imidazol) pH 7.4 e a eluição foi realizada utilizando um gradiente de imidazol (50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 6 M Ureia e 500 mM Imidazol) pH 7.4, até atingir 100% da concentração. Foram coletadas frações de 1 mL, e a análise do material foi realizada através de gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue (**Figura 02**).

[045] A retirada do sal das proteínas eluídas foi realizada através de cromatografia de afinidade no equipamento AKTA Pure25 (GE Healthcare, Healthcare, Bio-Sciences AB, Björkgatan 30 751 84 Uppsala, Sweden) utilizando a coluna HiTrap desalting Sephadex G-25 Superfine (GE Healthcare) seguindo as especificações de programação do equipamento para a coluna utilizada. A troca de tampão foi feita para o tampão fosfato de sódio (NaP) 50 mM, cloreto de sódio (NaCl) 0,15 M, pH 7,4 as frações foram coletada e a análise do material foi realizada através de gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue (**Figura 02**). A quantificação da produção proteica foi realizada utilizando o Quick Start™ Bradford.

Exemplo 4: Ensaios para avaliação da redução da reatividade da IgE

[046] Ensaios foram realizados a fim de definir o grau de redução da ligação da IgE ao híbrido hipoalergênico rDer p 2231 em relação ao extrato e aos alérgenos tipo-selvagem, produzidos de forma recombinante rDer p 1, rDer p 2 e rDer p 23. Após definir a concentração proteica, um ensaio imunoenzimático (ELISA), foi realizado para investigar as respectivas reatividades com IgE. Para tal, placas *Greiner Bio-One* (*Greiner Bio-One* Brasil, Americana - SP, Brasil) foram sensibilizadas com os antígenos recombinantes (5 µg/mL) e com extrato do *D. pteronyssinus* (DpE) ;100 µg/mL) em PBS 1x pH, 7.4, 16h a 4 °C. O bloqueio (PBS 1x / T 0,05% / SFB 10%) das placas foi realizado em temperatura ambiente 12h, 4°C. Em seguida, 30 soros de doadores alérgicos a *D. pteronyssinus* e 12 soros de doadores não alérgicos, diluídos

a 1:5 em PBS-T/SFB, foram incubados a 4 °C, por 16h. O anticorpo monoclonal anti-IgE humano conjugado com HRP (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) foi incubado durante 1h a 37 °C. Por fim, para detecção da absorbância a 450 nm, as placas foram incubadas utilizando uma solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) para a detecção colorimétrica num leitor de placas (Multiskan™ FC Microplate Photometer). Os resultados gerados pelo ELISA apresentaram redução significativa na ligação da IgE para rDer p 2231 quando comparados com rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e o DpE (**Figura 03**).

Exemplo 5: Avaliação in vivo do potencial terapêutico do híbrido hipoalergênico

Camundongos A/J machos foram sensibilizados subcutaneamente com 100 µg de extrato de DpE adsorvido em 4 mg/mL de Al(OH)₃ nos dias 0 e 7. Nos dias, 14, 15, 16, 18, 20, 22 e 24 os animais foram desafiados com instilação intranasal de DpE (10 µg em 50 µL de PBS). O grupo tratado com rDer p 2231 recebeu 25 µg da proteína diluída em PBS por injeções subcutâneas, diariamente dos dias 18 à 24 do protocolo experimental. O grupo Dexametasona foi tratado com fosfato dissódico de dexametasona (1 mg/kg). O grupo controle negativo recebeu solução salina nos procedimentos de sensibilização, desafio e tratamento. O controle positivo (DpE) foi tratado com injeções de solução salina. Nos dias em que os tratamentos coincidiam com os desafios, o tratamento era realizado uma hora após os desafios intranasais. Um dia após o último desafio, os animais foram eutanaziados com injeções intraperitoneais de xilazina e cetamina (40 mg/kg /peso corporal).

[047] A concentração de Der p 1 em DpE foi determinada usando um kit ELISA (INDOOR Biotechnologies, Charlottesville, VI, EUA). A concentração de Der p 1 foi de 16,17 ng por µg de proteína em DpE. A concentração dos níveis de endotoxinas (LPS, lipopolissacarídeo) no extrato alergênico e proteína híbrida foram quantificadas pelo ensaio Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (kit Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Quando necessário, a remoção do LPS foi feita da amostra usando a Resina de Remoção de Endotoxina Pierce de Alta Capacidade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

[048] Para obtenção do Lavado Broncoalveolar (BAL) uma cânula foi inserida na

traqueia do animal e aplicado uma solução contendo 500 µL de PBS 1x / BSA 1% gelado, sendo inoculando e retirando essa solução três vezes. O volume final foi centrifugado a 1952 g à 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -20 °C para posterior quantificação de anticorpos e citocinas. O *pellet* de células, por sua vez, foi ressuspenso na mesma solução para quantificação total de células e posterior contagem diferencial de leucócitos e avaliação da atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO). Um ELISA indireto foi utilizado para dosar IgE, IgG1 e IgG2a específicas contra DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23, rDer p 2231. Resumidamente, placas de alta ligação de 96 poços (*Greiner Bio-One* Brasil, Americana - SP, Brasil) foram revestidas com DpE (100 µg / mL) ou os antígenos recombinantes (5 µg / mL) durante a noite a 4 °C. Os poços foram bloqueados por 1 h com PBS-T 0,05% contendo soro fetal bovino 10% (FCS, Gibco, Pisley, Reino Unido) à temperatura ambiente. Depois disso, as amostras do BAL foram adicionadas, com as seguintes diluições: (i) puro para detecção da IgE contra DpE e antígenos recombinantes; (ii) 1:5 para detecção da IgG1 contra DpE e antígenos recombinantes; (iii) 1:1,25 para detecção da IgG2a contra DpE e antígenos recombinantes. IgE e IgG1 (*Abcam*, Cambridge, UK) ou IgG2a (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA) conjugadas com HRP na diluição de: IgE 1:250; IgG1 e IgG2a 1:1000 foram adicionadas aos poços e incubados durante a noite ou durante 1h em temperatura ambiente, respectivamente. Em seguida, a detecção foi realizada com 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (*BD Pharmingen*, San Diego, CA, EUA) e a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. A absorbância foi determinada em 450 nm. em um leitor de placas (*Multiskan™ FC Microplate Photometer*). Em relação aos anticorpos específicos (slg) contra DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e rDer p 2231, embora não tenha ocorrido aumento significativo da produção de slgE em animais tratados com rDer p 2231, foi observado uma diminuição significativa de slgE em relação ao controle positivo para DpE, rDer p 2, rDer p 23. E também uma diminuição significativa de slgE em relação a rDer p 2 nos animais tratado com Dexametasona (**Figura 4**). Além disso, ocorreu aumento de slgG1 tanto para Der p 1 e rDer p 2231, além de um aumento significativo slgG1 para DpE, rDer p 2 e rDer p 23 nos animais tratados com rDer p 2231 quando comparado com o grupo controle negativo. Observa-se um aumento significativo slgG1 para rDer p 2 nos animais tratados com rDer p 2231 quando comparado com o grupo positivo (**Figura 4**). Todavia, os animais tratados com rDer p 2231 apresentaram níveis aumentados

da slgG2a contra rDer p 23 e níveis aumentados significativamente slgG2a contra DpE e rDer p 2231 em relação ao controle negativo, rDer p 2231 também apresentou níveis significativamente aumentados de slgG2a para rDer p 2231 em relação ao controle positivo (**Figura 4**).

[049] Foi feita a lavagem do pulmão injetando 5 mL de salina através do coração do animal. O lóbulo direito do pulmão foi retirado, pesado (100 mg) e macerado com a adição de 1 mL de PBS 1x contendo inibidor de protease, centrifugado a 1700 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante coletado. A ruptura de tecidos e células foi feita com o sonicador de sonda (Q55 Qsonica®), usado para rompimento celular (25 kHz; 15 segundos). Os passos de sonicação foram repetidos sete vezes com intervalos de 15 segundos, após a ruptura de tecidos e células o material foi sonicado e centrifugado a 1500 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante desta centrifugação foi então analisado por ELISA para dosar slgE, slgG1 e slgG2a para os mesmos antígenos analisados nas amostras de BAL. Os parâmetros de todos ELISA foram os mesmos, com exceção da etapa da adição das amostras de tecido pulmonar, cujas diluições foram: (i) puro para detecção da IgE contra DpE e antígenos recombinantes; (ii) 1:10 para detecção da IgG1 contra DpE e antígenos recombinantes; (iii) 1:5 para detecção da IgG2a contra DpE e antígenos recombinantes. No que se refere as slg contra DpE foi observado uma diminuição significativa de slgE em relação ao controle positivo para DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e rDer p 2231 nos animais tratado com rDer p 2231 (**Figura 5**). Além disso, ocorreu aumento significativo de slgG1 para DpE, rDer p 2, rDer p 23 e rDer p 2231 nos animais tratados com rDer p 2231 quando comparado com o grupo controle negativo, rDer p 2231 demonstrou um aumento significativo de slgG1 nos animais tratados com a própria rDer p 2231 em relação ao controle positivo. rDer p 23 e rDer p 2231 também demonstrou aumento significativo de slgG1 nos animais tratado com dexametasona (**Figura 5**). Todavia, os animais tratados com rDer p 2231 apresentaram níveis significativamente aumentados de slgG2a contra DpE e rDer p 2231 em relação ao controle negativo. E rDer p 2231 também apresentou níveis aumentados significativamente de slgG2a para rDer p 2231 em relação ao controle positivo (**Figura 5**).

[050] O sangue dos camundongos foi coletado acessando a veia braquial. Após centrifugação a 13.000 g a 4 ° C por 10 minutos, os soros foram obtidos e congelados

a -20 ° C. Um ELISA indireto foi utilizado para detectar os anticorpos específicos anteriormente mencionados. Porém, as amostras de soro foram adicionadas, com as seguintes diluições: (i) 1:5 para IgE seja para detecção contra DpE ou antígenos recombinantes; (ii) 1:50 para detecção da IgG1 contra o recombinante rDer p 1; (iii) 1:25 para detecção da IgG1 contra os recombinantes rDer p 2, rDer p 23, rDer p 2231; (iv) 1:3200 para a detecção da IgG1 contra DpE; (v) 1:12,5 para a detecção da IgG2a contra DpE ou antígenos recombinantes. IgE, IgG1 (*Abcam*, Cambridge, UK) ou IgG2a (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) conjugadas com HRP foram adicionadas aos poços e estes foram incubados durante a noite ou durante 1h em temperatura ambiente, respectivamente. As diluições dos conjugados foram: (i) 1:500 para detecção da IgE contra DpE e antígenos recombinantes, respectivamente; (ii) 1:2000 e 1:1000 para detecção da IgG1 e IgG2a contra os recombinantes e DpE, respectivamente. Reações enzimáticas e leituras também foram realizadas como já mencionado. Em relação as slgs, houve redução da produção de IgE em animais tratados com rDer p 2231, sendo essa redução significativa para rDer p 2 e rDer p 23 (**Figura 6**). Além disso, ocorreu aumento slgG1 tanto para rDer p 1, rDer p 2 e rDer p 23, e um aumento significativo de slgG1 para DpE como para rDer p 2231 nos animais tratados com rDer p 2231 quando comprado com o grupo controle negativo (**Figura 6**). Todavia, os animais tratados com rDer p 2231 apresentaram níveis aumentados da slgG2a contra rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23, rDer p 2231 e níveis aumentados significativamente da slgG2a contra DpE em relação ao controle negativo (**Figura 6**).

Exemplo 5: Ensaios para contagens total e diferencial de células do BAL

Conforme anteriormente descrito, após a obtenção do *pellet* de células do BAL, uma contagem total das células feita em câmara de Neubauer a partir da coloração com Azul de Tripán 0,1%. Conforme mostrado na (**Figura 7A**), os animais tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231 apresentaram uma regulação negativa das células imunes inflamatórias, sendo estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle positivo.

[051] Uma alíquota das células do BAL foi utilizada para realizar o citoesfregaço (cytospin) em duplicata, acrescentando 200 µl do lavado em cada caçapa do aparelho, centrifugado por 5 minutos a 500 rpm em temperatura ambiente. Logo em seguida as

lâminas foram retiradas e colocadas para secagem e posteriormente submetidas a coloração de Romanowsky – Giemsa (Panótico rápido, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). O perfil das células foi determinado através de características morfológicas de 100 leucócitos por animal, utilizando-se para isso um microscópio biológico binocular modelo L-1000 bac (Bioval, Bauru-SP) em objetiva de imersão (aumentado de 1000x). Os animais tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231 produziu um número significativamente menor de eosinófilos em comparação com os animais do grupo positivo (**Figura 7B**). Foi observada uma diminuição de neutrófilos após o tratamento com rDer p 2231 (**Figura 7B**). Embora não tenha havido diferenças significativas no número de linfócitos, observa-se um aumento destes em comparação com animais do grupo positivo. O número de macrófagos foi significativamente maior nos animais tratados com dexametasona comparado com os animais do grupo positivo (**Figura 7B**).

Exemplo 6: Ensaio para avaliação da peroxidase de eosinófilos (EPO)

[052] A atividade da EPO presente no BAL foi determinada por meio do ensaio colorimétrico. Após a realização da contagem total e citoanálises, o volume restante de células passou por ruptura através da utilização de um sonicador de sonda (Q55 Qsonica®), usado para rompimento celular 25 kHz; 15 segundos. Os passos da sonicação foram repetidos sete vezes com intervalos de 15 segundos, após a ruptura de tecidos e células o material foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos a 4°C. Tal sobrenadante foi analisado em um ensaio enzimático *in vitro*.

[053] A lavagem do pulmão foi feita injetando 5 mL de salina através do coração do animal, o lóbulo direito do pulmão foi retirado, seccionado, pesado (100 mg) e macerado com a adição de 1 mL de PBS 1x contendo inibidor de protease, centrifugado (1700 g, 10 min, 4 °C). Os detritos residuais foram incubados com tampão de lise de hemácias, produzindo uma suspensão final de 10% (p / v) em PBS 1x mais 0,5% de HTAB. A ruptura de tecidos e células foi feita com descrito acima.

[054] Os sobrenadantes do BAL ou tecido pulmonar foram plaqueados, por meio de 6 diluições seriadas, em placas de 96 poços. A detecção da EPO foi realizada adicionando em cada poço 150 µL do o-Phenylenediamine dihydrochloride (Sigma

Chemical Co., St. Louis, Mo, EUA) mais peróxido de hidrogênio em tris HCl, pH 8,0. O material foi incubado por 30 minutos no escuro e a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. A absorbância foi determinada em 492 nm em um leitor de placas (Multiskan™ FC Microplate Photometer).

[055] Enquanto o grupo controle positivo apresentou atividade da EPO significativamente maior em ambos os locais avaliados (BAL e tecido pulmonar), em comparação com o grupo controle negativo, a atividade da enzima foi significativamente reduzida nos camundongos tratados com rDer p 2231, em comparação com o grupo controle positivo (**Figura 8**).

EXEMPLO 7: Resposta de células T ao híbrido hipoalergênico

[056] O tipo de resposta imune das células T e perfil de modulação foram inferidos mediante a quantificação dos níveis de citocinas produzidas em lavado broncoalveolar, pulmão e reestimulação de células de culturas de esplenócitos *in vitro*. As citocinas IL-4 e IL-5 foram dosadas para inferir a resposta de células T-helper tipo 2 (Th2), INF- γ para a resposta de células T-helper tipo (Th1) e, por fim, IL-10 para células T-regulatórias (Treg).

[057] Para avaliação dos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e INF- γ nos sobrenadantes do BAL e processamento do tecido pulmonar, foi usado um ELISA captura comercial (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA).

[058] Para a cultura de esplenócitos, o baço foi removido, macerado, centrifugado (7 min, 1200 rpm / 4 °C) e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de tampão ACK (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,2-7,4); após a lise dos eritrócitos e centrifugação, o sedimento obtido foi ressuspenso em meio RPMI suplementado com 200 mM de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal de bovino inativado (Gibco, Pislely, UK). As células foram, em seguida, contadas em câmara de Neubauer com Azul de Tripán 0,1%. As células foram em seguida plaqueadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços de fundo plano (Costar, Cambridge, MA, EUA) a uma densidade de 2x10⁵ células/poço. As células foram reestimuladas com DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e a proteína

quimérica hipoalergênica rDer p 2231, além dos controles positivos (IL-10 – LPS a 1000 ng/mL ou outras citocinas – PHA a 1:50) e controle negativo (células não estimuladas). As células foram incubadas a 37°C numa atmosfera umidificada, com 5% de CO₂ durante 48 ou 72 horas. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e analisados por ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA).

[059] No BAL foi observado uma redução de IL-4 estatisticamente significativa entre os animais tratados com rDer p 2231 quando comparado com os animais do grupo controle positivo e também com os tratados com dexametasona. A IL-5 também reduziu significativamente entre os animais tratados com rDer p 2231 quando comparado com controle positivo. Já IL-10 e IFN- γ não apresentaram redução ou aumento (**Figura 9**). Uma redução significativa foi observada nas citocinas IL-4 e IL-5 no pulmão, entre os animais tratados com rDer p 2231 quando comparado com o grupo controle positivo. Para o pulmão, foi observado uma redução significativa de IL-10, mas não de IFN- γ em animais tratados com a vacina ou dexametasona (**Figura 9**).

Os esplenócitos dos animais tratados com a quimérica hipoalergênica rDer p 2231 e reestimuladas com DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23, rDer p 2231 e os controles, mesmo que não estatisticamente significativa, reduziram a produção de IL-4 e IL-5 quando comparado com os esplenócitos de animais não tratados e que receberam os mesmos reestímulos (**Figura 10 e Figura 11**). Para IL-10 e IFN- γ foram observados níveis elevados dessas citocinas, sendo: IL-10 estatisticamente significativa para os reestímulos com DpE, rDer p 1, rDer p 2231 e os controles, quando comparado com os outros grupos de tratamento (**Figura 12**); O IFN- γ mostrou níveis altos e significantes para os reestímulo com DpE, rDer p 223 quando comparado com os outros grupos de tratamento e PHA, significativo ao controle negativo dentro do próprio grupo (**Figura 13**).

Breve descrição das Figuras

[060] **Figura 1.** Estruturas terciárias tridimensionais das diferentes modificações realizadas em relação a posição dos peptídeos de epítopos de células T dos alérgenos

Der p 1, Der p 2 e p 23, a fim de definir o melhor modelo com base na quantidade de domínios funcionais, valor-P e uGDT (GDT) gerado por meio do servidor RaptorX.

[061] **Figura 2.** Expressão e purificação do híbrido hipoalergênico rDer p 2231 na linhagem BL21(DE3)pLysS, analisada em SDS-PAGE 12%. (PM) Padrão de peso molecular; (1) Antes da indução com IPTG; (2) Após IPTG (1 mmol / L), indução de 1 h; (3) Após IPTG (1 mmol / L), indução de 6 h; (4) Fração solúvel do extrato bacteriano; (5) Sedimento bacteriano solubilizado (6 mol / L uréia); (6) Amostra representativa da cromatografia de afinidade; (7) Amostra representativa da dessalinização.

[062] **Figura 3.** Avaliação dos níveis de reatividade de IgE determinada por ELISA indireto em soros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*. Foi detectada uma redução significativa de IgE para o híbrido hipoalergênico rDer p 2231 em comparação com o extrato e moléculas recombinantes nativas (rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23). Símbolos para significâncias são mostrados no gráfico. A quantidade de símbolos representa o grau de significância quando ANOVA, com pós-teste de Mann whitney ou Kruskal wallis utilizados, a depender da distribuição dos dados. O valor mediano dos resultados do grupo é representado por linhas sólidas horizontais curtas; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,0001; ns: não significativo.

[063] **Figura 4.** Níveis específicos de IgE, IgG1 e IgG2a contra DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e do híbrido hipoalergênico rDer p 2231 produzidos por camundongos tratados e não tratados com rDer p 2231. A produção de anticorpos no BAL de camundongos foi determinada por ELISA indireto. Símbolos para significâncias são mostrados em cada gráfico. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; * - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância quando ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados, a depender da distribuição dos dados. Um símbolo, P < 0,05; dois símbolos P < 0,01; três símbolos P < 0,0001; e quatro símbolos P < 0,00001.

[064] **Figura 5.** Níveis específicos de IgE, IgG1 e IgG2a contra DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e rDer p 2231 produzidos por camundongos tratados e não tratados com

o híbrido hipoalergênico rDer p 2231. A produção de anticorpos no pulmão de camundongos foi determinada por ELISA indireto. Símbolos para significâncias são mostrados em cada gráfico. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; * - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância quando ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados, a depender da distribuição dos dados. Um símbolo, $P < 0,05$; dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$.

[065] **Figura 6.** Níveis específicos séricos de IgE, IgG1 e IgG2a contra DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23 e rDer p 2231 produzidos por camundongos tratados e não tratados com híbrido hipoalergênico rDer p 2231. A produção de anticorpos no soro de camundongos foi determinada por ELISA indireto. Símbolos para significâncias são mostrados em cada gráfico. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; * - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância quando ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados, a depender da distribuição dos dados. Um símbolo, $P < 0,05$; dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$.

[066] **Figura 7.** Efeito da proteína híbrida hipoalergênica rDer p 2231 sobre a inflamação celular alérgica. (A) Contagem de células total (B) Contagem de células diferencial. Símbolos para significâncias são mostrados em cada gráfico. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; * - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância quando ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados, a depender da distribuição dos dados. Um símbolo, $P < 0,05$; dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$.

[067] **Figura 8.** Análise do efeito da proteína hipoalergênica rDer p 2231 na atividade da peroxidase de eosinófilos em células do BAL e do tecido pulmonar de

camundongos. Símbolos para significâncias são mostrados em cada gráfico. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; * - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância quando ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados, a depender da distribuição dos dados. Um símbolo, $P < 0,05$; dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$.

[068] **Figura 9.** Análise do efeito de resposta das células T e perfil de modulação da proteína hipoalergênica rDer p 2231 produzidos por camundongos, inferidos mediante a quantificação dos níveis de citocinas (pg / mL) produzidas em (A) lavado bronco alveolar e (B) tecido pulmonar. Símbolos para significâncias são mostrados no gráfico. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; * - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância quando ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados, a depender da distribuição dos dados. Um símbolo, $P < 0,05$; dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$.

[069] **Figura 10.** Resultados do efeito de resposta das células T-helper tipo 2 (Th2) mostrando os índices de IL-4 produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231, obtidos mediante a quantificação dos níveis de citocinas (pg / mL) e inferidos pelos índices de estimulação de esplenócitos ao DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23, rDer p 2231, controle e PHA, cultivados por 72 horas. Símbolos para significâncias são mostrados em cada gráfico. * - Comparações em relação as células do controle (produção basal, sem reestímulo). Notar que a cor para esse símbolo foi igual ao respectivo grupo do modelo animal. Cinza, vermelho, azul e verde para os grupos controle negativo, controle positivo, Dexa (tratados com dexametasona) e Der p 2231 (trados com a vacina hipolargênica). Os testes utilizados para tal análise foram teste t pareado ou teste pareado de Wilcoxon, a depender da distribuição dos dados. A quantidade de símbolos representa o grau de significância, sendo * $< 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$; e **** $P < 0,00001$. Outra análise foi realizada para comparar os resultados dos diferentes grupos de animais frente a restimulação com os diferentes estímulos. ANOVA com pós-teste de Tukey ou

Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados neste caso. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; Δ - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância. Um símbolo, $P < 0,05$; dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$. Notar que as cores para cada grupo do modelo animal também foram aqui utilizadas.

[070] **Figura 11.** Resultados do efeito de resposta das células T-helper tipo 2 (Th2) mostrando os índices de IL-5 produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231, obtidos mediante a quantificação dos níveis de citocinas (pg / mL) inferidos pelos índices de estimulação de esplenócitos ao DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23, rDer p 2231, controle e PHA, cultivados por 72 horas. * - Comparações em relação as células do controle (produção basal, sem reestímulo). Notar que a cor para esse símbolo foi igual ao respectivo grupo do modelo animal. Cinza, vermelho, azul e verde para os grupos controle negativo, controle positivo, Dexa (tratados com dexametasona) e Der p 2231 (trados com a vacina). Os testes utilizados para tal análise foram teste t pareado ou teste pareado de Wilcoxon, a depender da distribuição dos dados. A quantidade de símbolos representa o grau de significância, sendo * $< 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$; e **** $P < 0,00001$. Outra análise foi realizada para comparar os diferentes grupos de animais frente a restimulação com os diferentes estímulos. ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados neste caso. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; Δ - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância. Um símbolo, $P < 0,05$; dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$. Notar que as cores para cada grupo do modelo animal também foram aqui utilizadas.

[071] **Figura 12.** Resultados do efeito do perfil de modulação de resposta de esplenócitos, mostrando os índices de IL-10 produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231, obtidos mediante a quantificação dos níveis de citocinas (pg / mL) inferidos pelos índices de estimulação de esplenócitos ao DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23, rDer p 2231, controle e LPS, cultivados por 48 horas. * - Comparações em relação as células do controle (produção

basal, sem reestímulo). Notar que a cor para esse símbolo foi igual ao respectivo grupo do modelo animal. Cinza, vermelho, azul e verde para os grupos controle negativo, controle positivo, Dexa (tratados com dexametasona) e Der p 2231 (tratados com a vacina). Os testes utilizados para tal análise foram teste t pareado ou teste pareado de Wilcoxon, a depender da distribuição dos dados. A quantidade de símbolos representa o grau de significância, sendo * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$; e **** $P < 0,00001$. Outra análise foi realizada para comparar os diferentes grupos de animais frente a restimulação com os diferentes estímulos. ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados neste caso. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; Δ - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância. Um símbolo, $P < 0,05$; dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$. Notar que as cores para cada grupo do modelo animal também foram aqui utilizadas.

[072] **Figura 13.** Resultados do efeito de resposta das células T-helper tipo 1 (Th1) mostrando os índices de INF γ produzidos por camundongos tratados e não tratados com o híbrido hipoalergênico rDer p 2231, obtidos mediante a quantificação dos níveis de citocinas (pg / mL) inferidos pelos índices de estimulação de esplenócitos ao DpE, rDer p 1, rDer p 2, rDer p 23, rDer p 2231, controle e PHA, cultivados por 72 horas. * - Comparações em relação as células do controle (produção basal, sem reestímulo). Notar que a cor para esse símbolo foi igual ao respectivo grupo do modelo animal. Cinza, vermelho, azul e verde para os grupos controle negativo, controle positivo, Dexa (tratados com dexametasona) e Der p 2231 (tratados com a vacina). Os testes utilizados para tal análise foram teste t pareado ou teste pareado de Wilcoxon, a depender da distribuição dos dados. A quantidade de símbolos representa o grau de significância, sendo * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$; e **** $P < 0,00001$. Outra análise foi realizada para comparar os diferentes grupos de animais frente a restimulação com os diferentes estímulos. ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados neste caso. # - Comparações em relação ao grupo controle negativo; Δ - Comparações em relação ao grupo controle positivo; § - Comparações em relação ao grupo Dexa (tratados com dexametasona). A quantidade de símbolos representa o grau de significância. Um símbolo, $P < 0,05$;

dois símbolos $P < 0,01$; três símbolos $P < 0,0001$; e quatro símbolos $P < 0,00001$.
Notar que as cores para cada grupo do modelo animal também foram aqui utilizadas.

FIGURAS

FIGURA 1

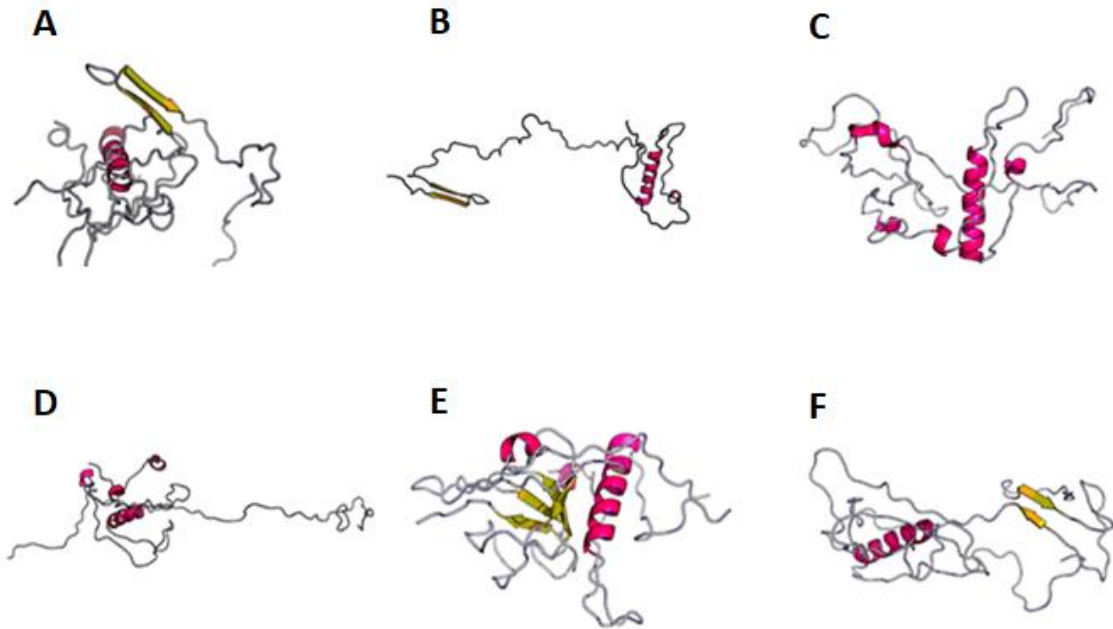


FIGURA 2

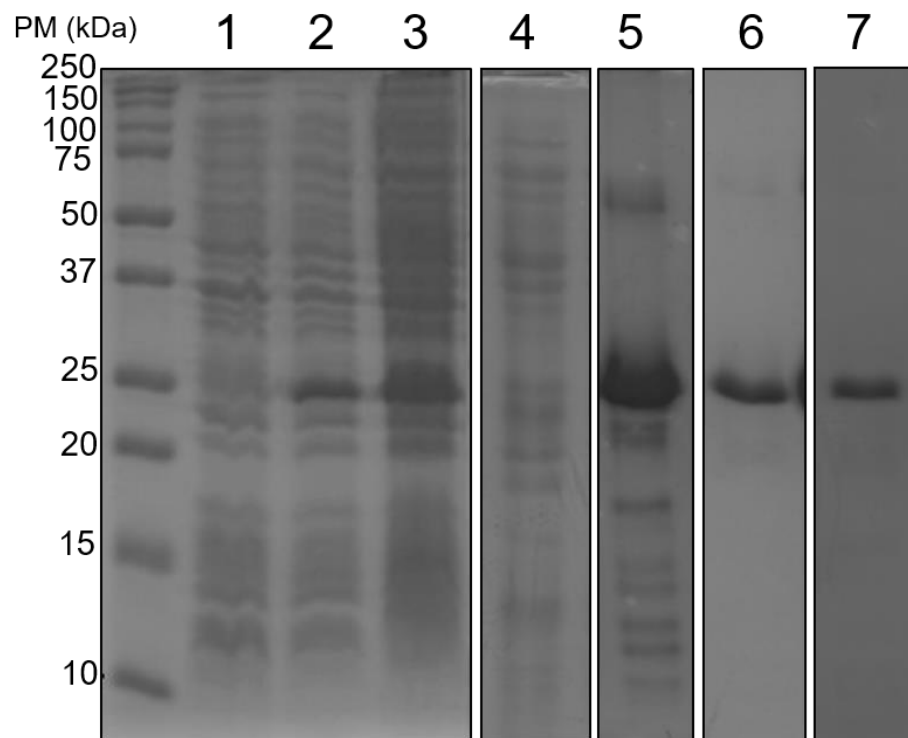


FIGURA 3

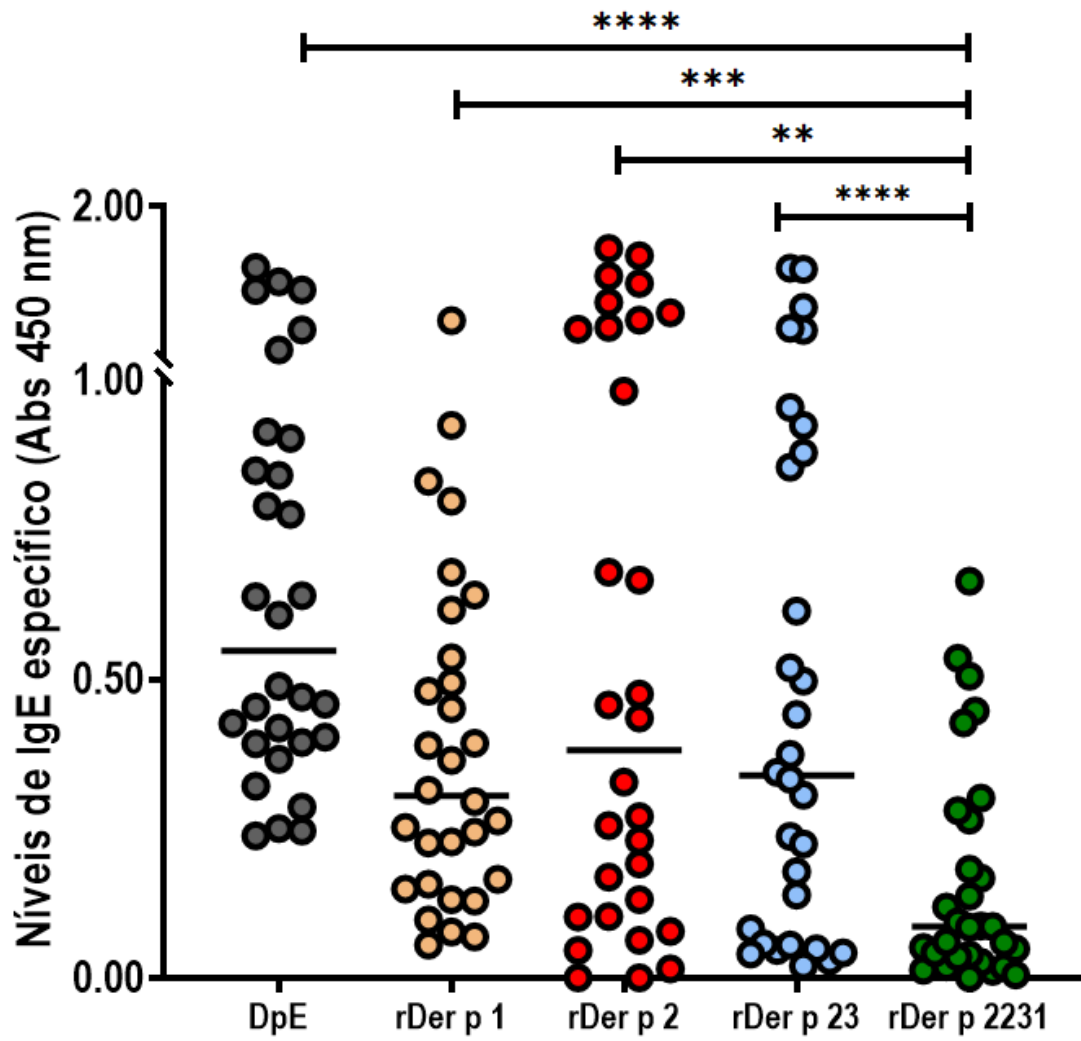


FIGURA 4

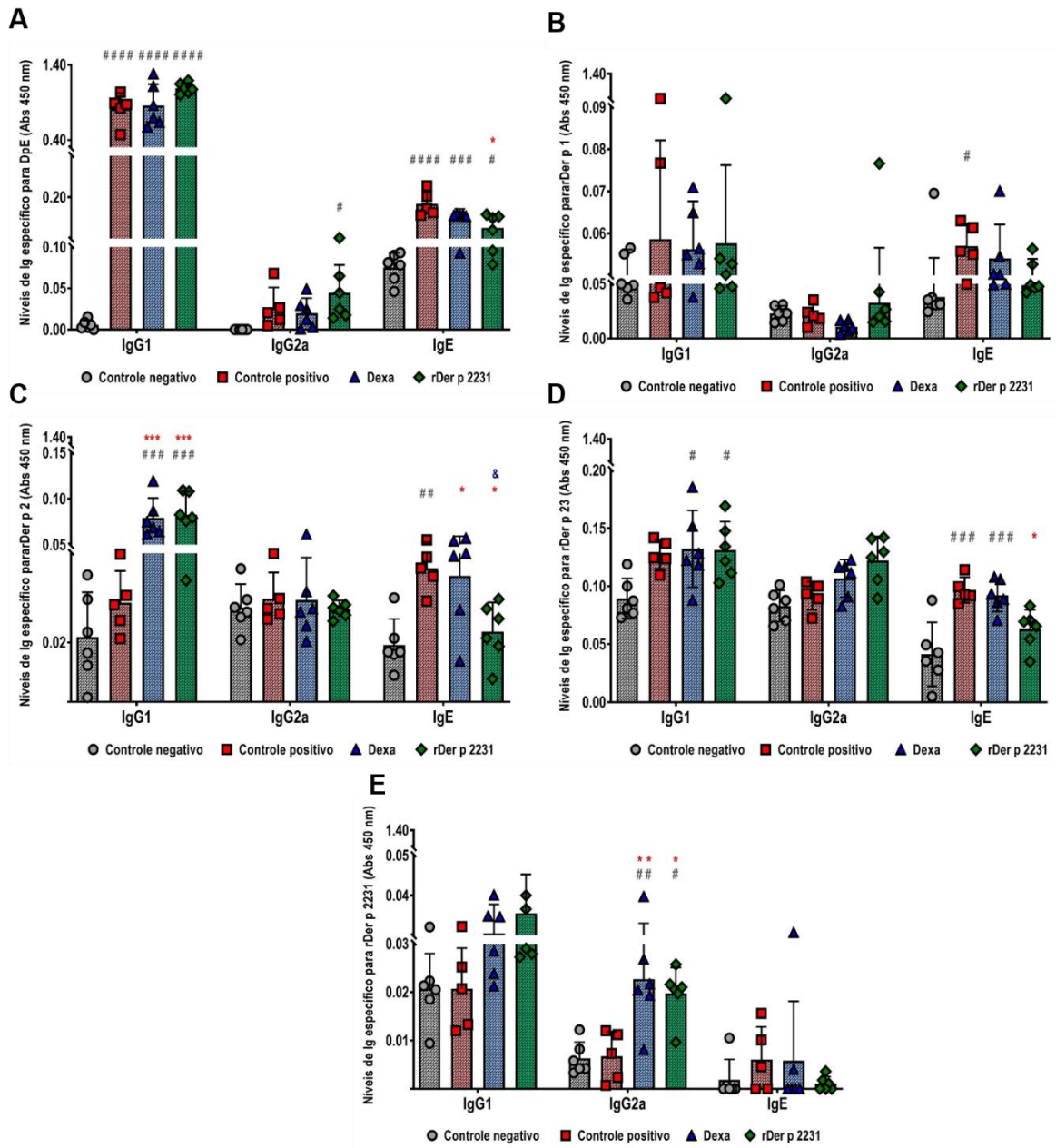


FIGURA 5

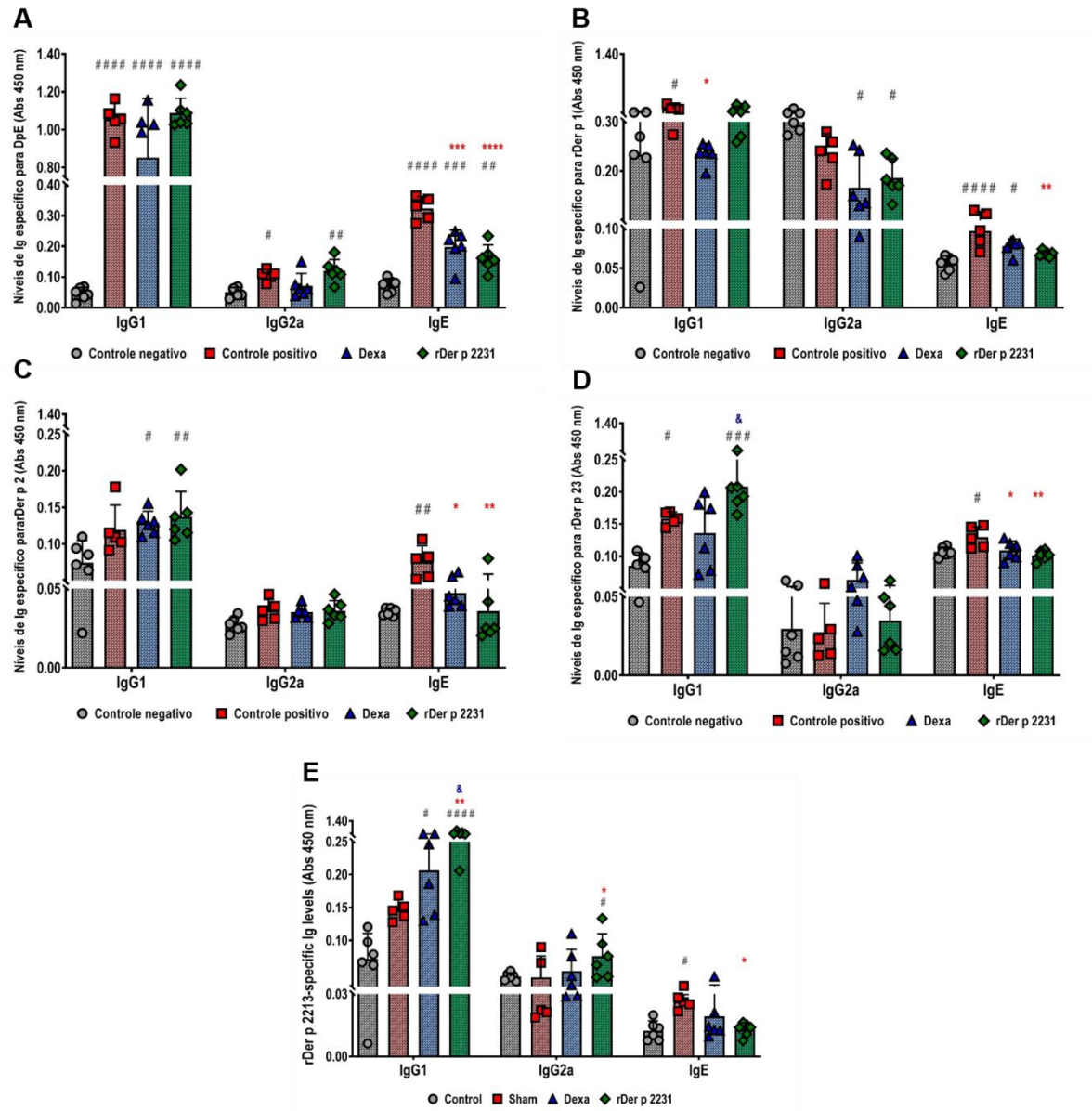


FIGURA 6

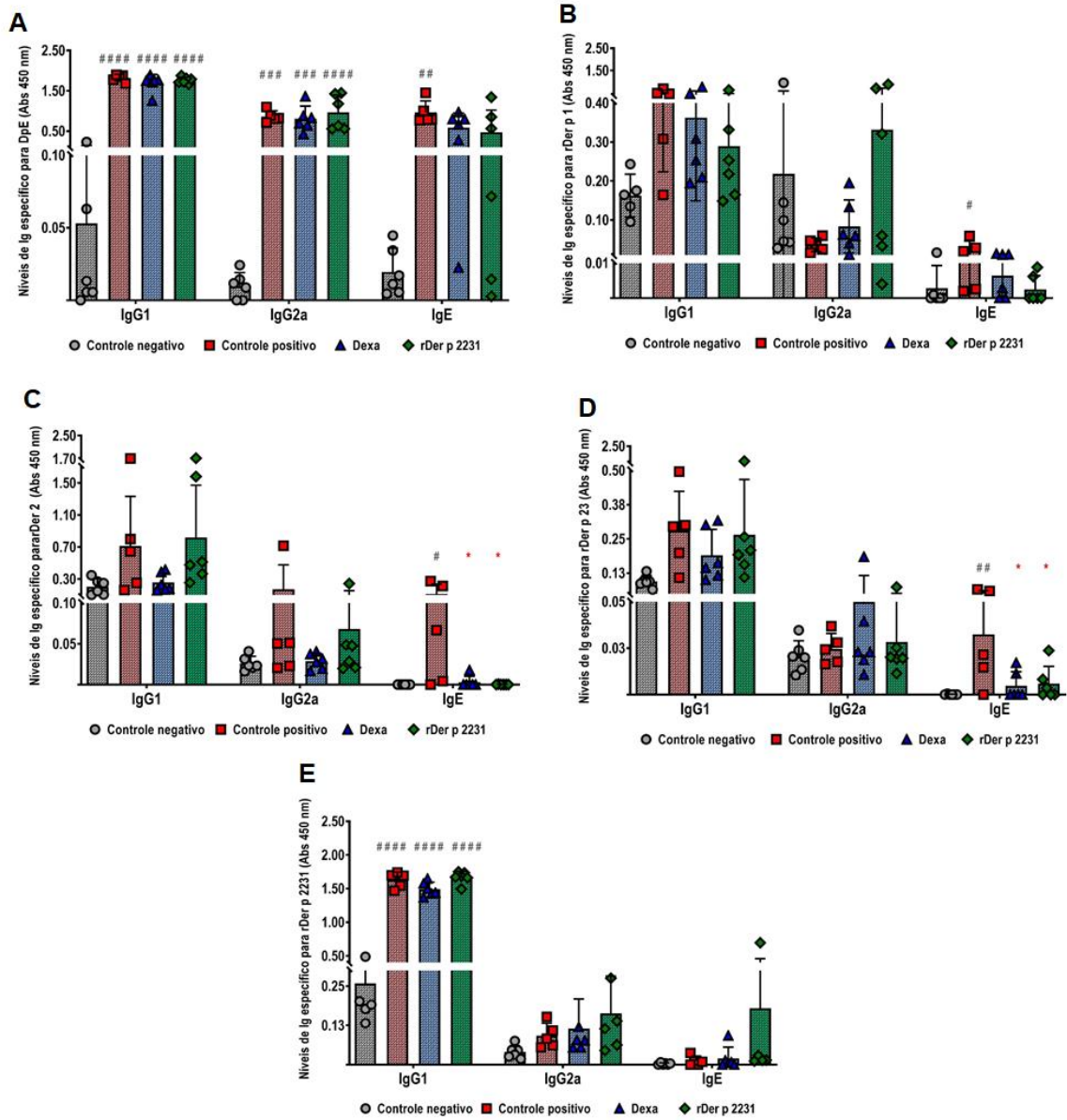
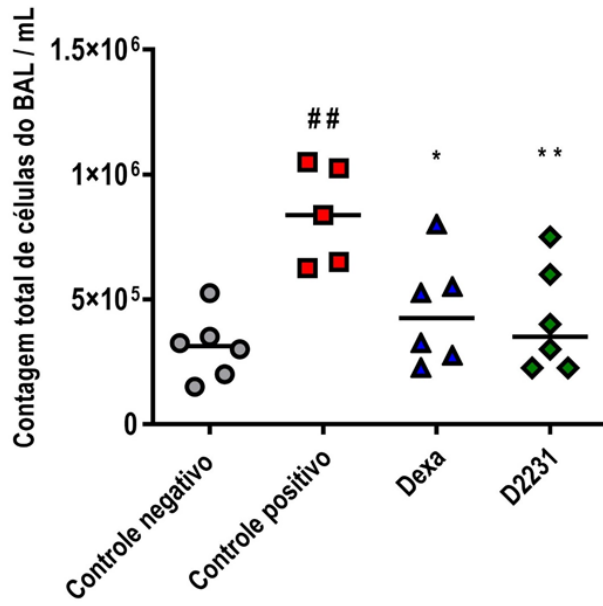


FIGURA 7

A



B

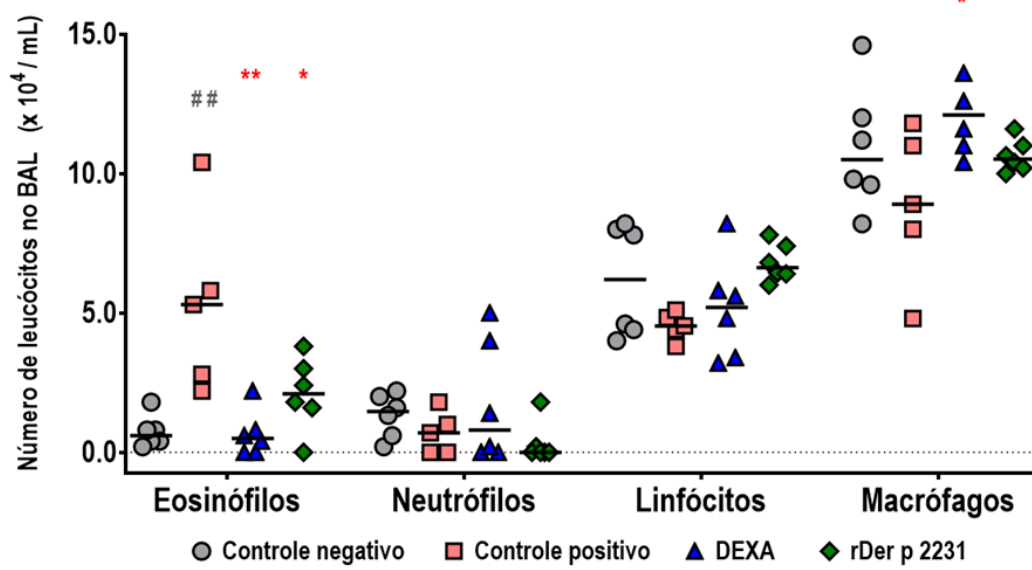


FIGURA 8

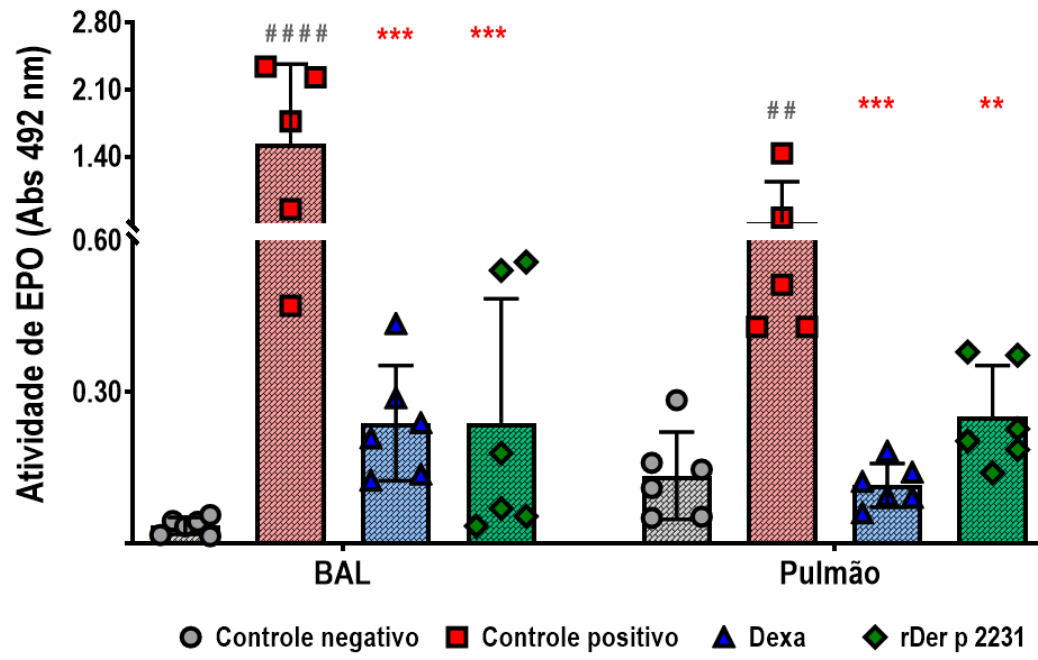


FIGURA 9

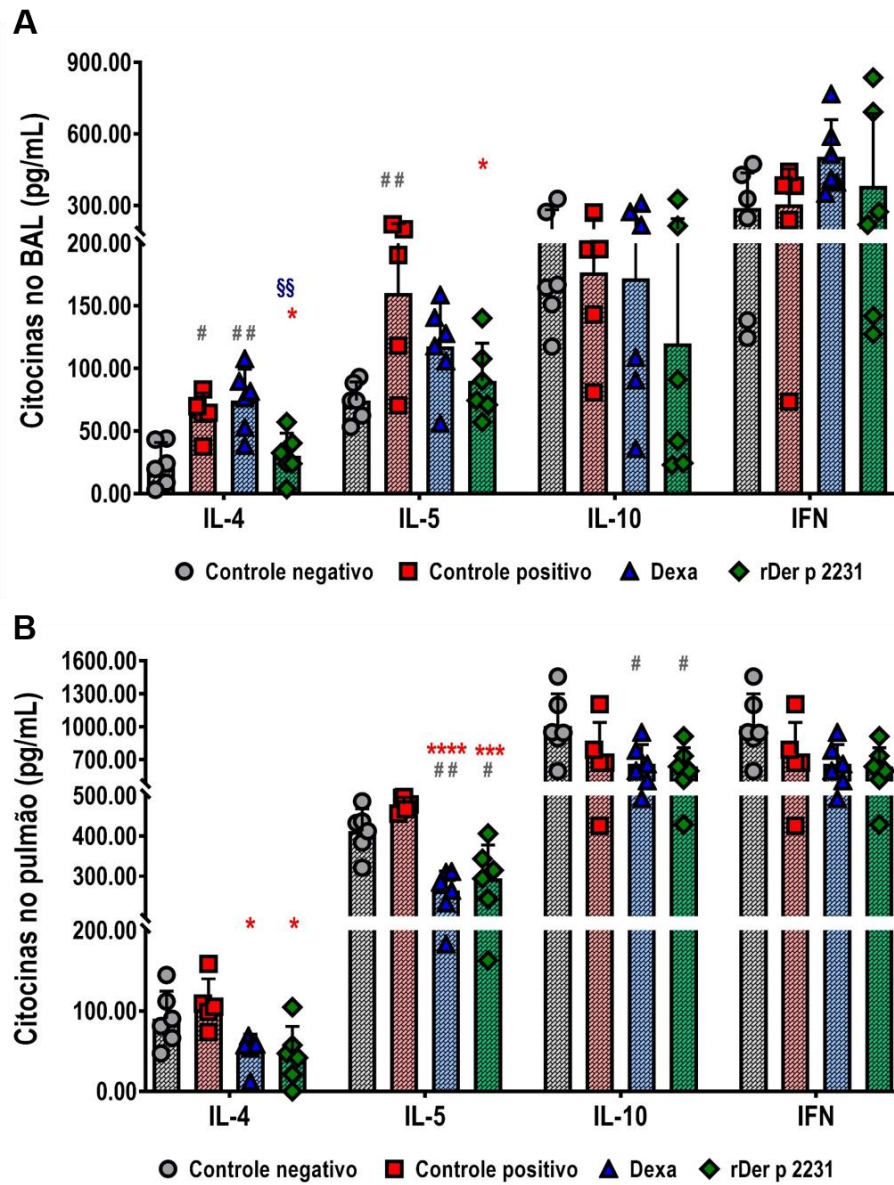


FIGURA 10

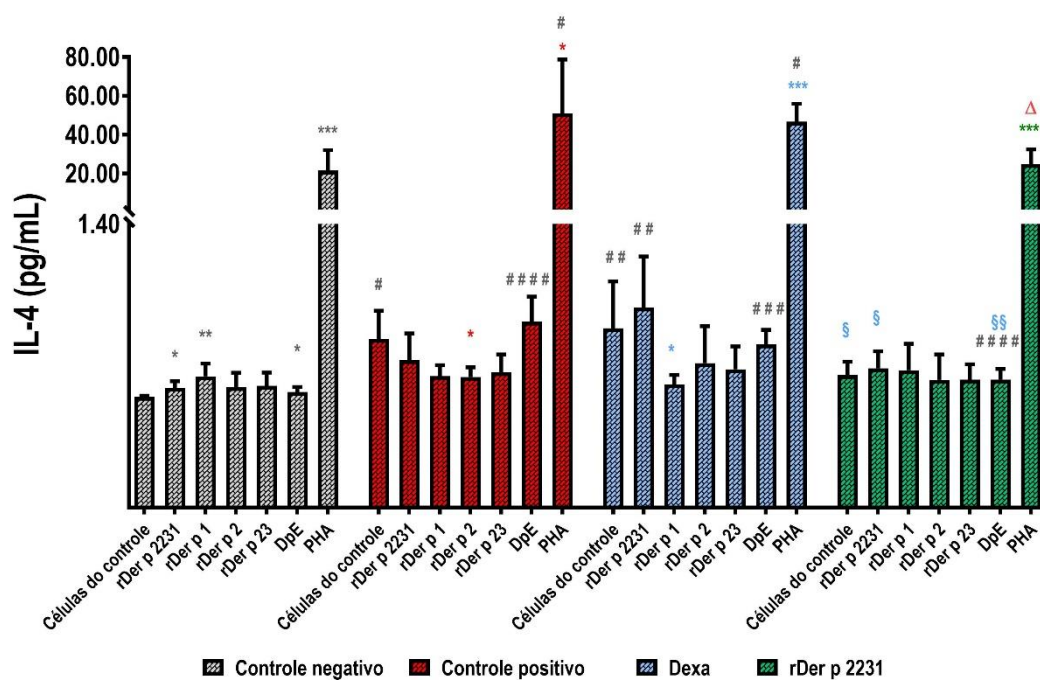


FIGURA 11

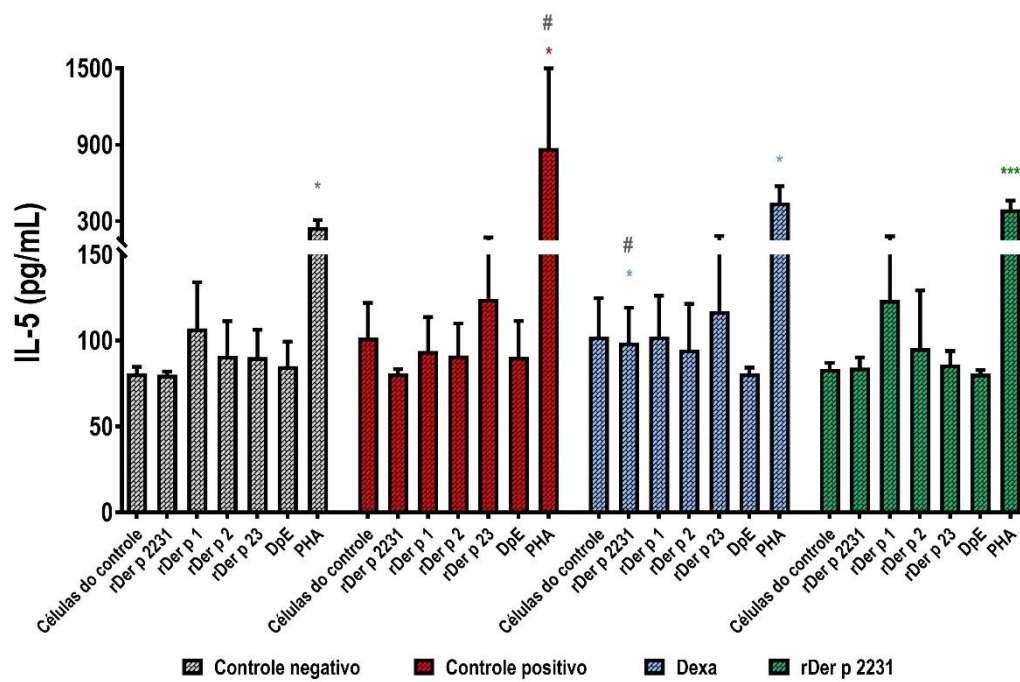


FIGURA 12

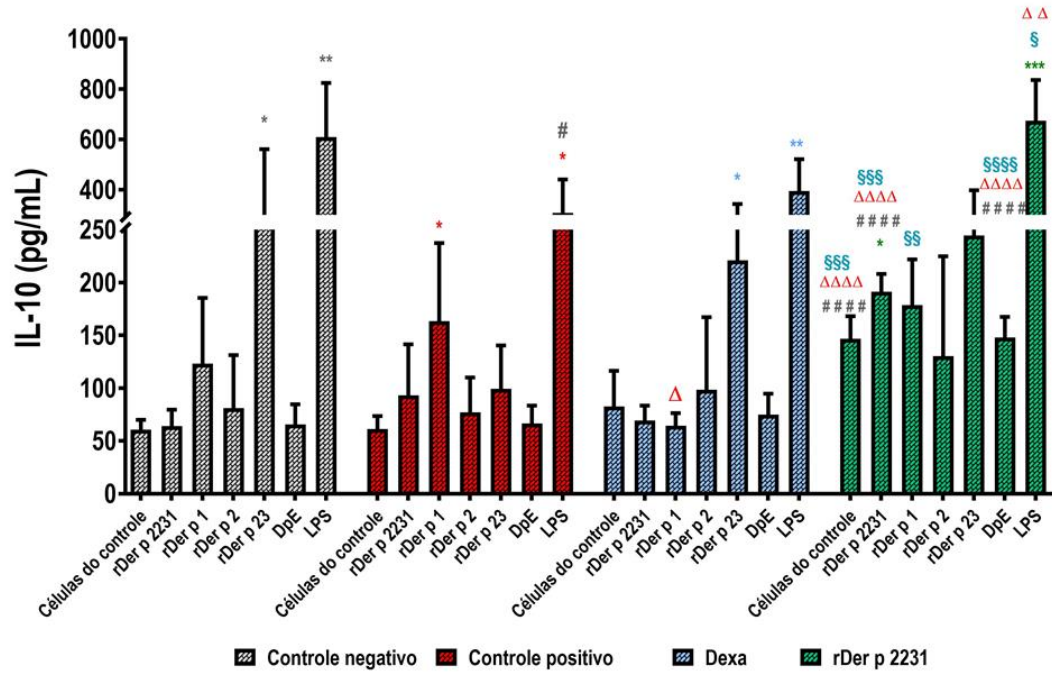
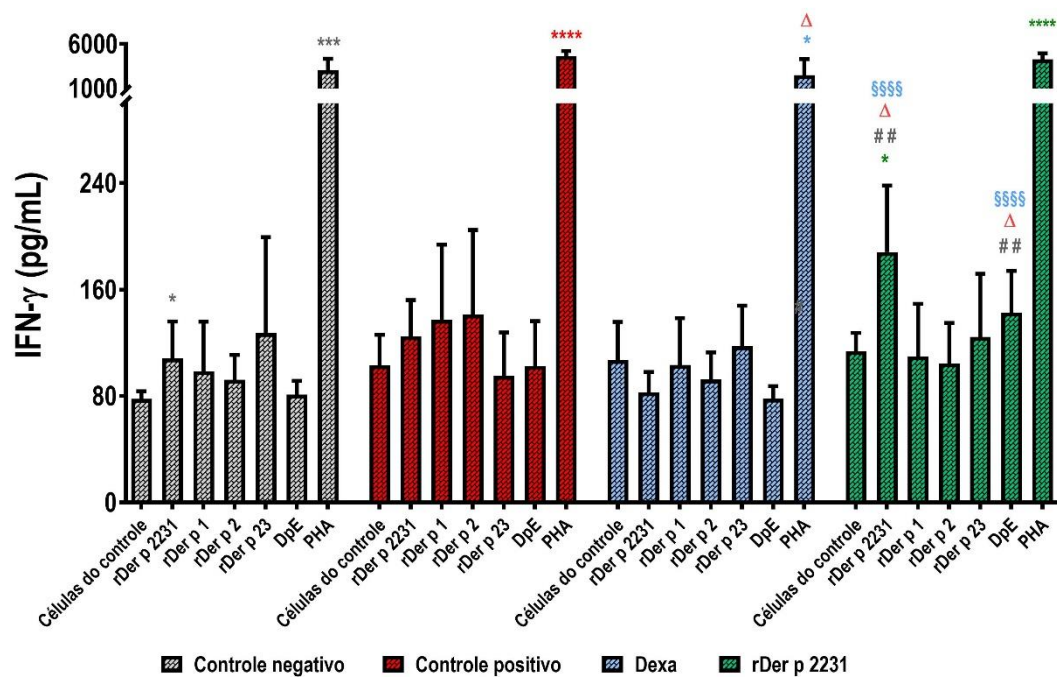


FIGURA 13



SEQUÊNCIAS**SEQ ID NO.: 1**

MDLRQMRTVT PIRMQGGCGS CKKGCSCWA FSGVAATESA YLAKKQESYY
RYVAREQSCR KKHAVN IVGY SNAQGVDEAA AKPKDPHKFY ICSNWEAVHK
DCEAAAKCHG SEPCIIHRGK PFQLEAVKKY DIKY TWNVPK IAPKSENVVK
KNTKTAKIEI KASIDGKKG V LACAIATHAK IRD

SEQ ID NO.: 2

GGA TCC ATG GAT CTG CGT CAG ATG CGT ACC GTG ACC CCG ATT CGT ATG
CAG GGC GGC TGT G GC TCT TGT AAA AAA GGC TGT GGT TCT TGT TGG GCA
TTT AGC GGC GTG GCC GCA ACC GAA TC A GCC TAT CTG GCC AAA AAA CAG
GAA TCT TAT TAT CGC TAT GTT GCA CGC GAA CAG AGC TGT CGT AAA AAA
CAT GCA GTG AAT ATT GTT GGC TAT AGT AAT GCA CAG GGT GTT GAT GAA
GCA GCC GCC AAA CCG AAA GAT CCG CAT AAA TTT TAT ATT TGT AGT AAT
TGG GAA GCA GTT CAT A AA GAT TGT GAA GCC GCA GCC AAA TGT CAT GGT
AGT GAA CCG TGT ATT ATT CAT CGC GGC AA A CCG TTT CAG TTA GAA GCC
GTT AAA AAA TAT GAT ATT AAA TAT ACC TGG AAT GTT CCG AAA ATT GCC
CCG AAA TCA GAA AAT GTG GTT AAA AAA AAT ACC AAA ACC GCC AAA ATT
GAA ATT AAA GCA AGT ATT GAT GGT AAA AAA GGT GTG CTG GCC TGT GCC
ATT GCC ACC CAT GCC AAA ATT CGC GAT CTC GAG

REIVINDICAÇÕES

1. **PROTEÍNA RECOMBINANTE HIPOALERGÊNICA *caracterizada por*** uma proteína recombinante derivada de sequências proteicas de regiões antigênicas de epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 do ácaro da poeira doméstica *Dermatophagoides pteronyssinus*, as quais exibem reduzida atividade alérgica, possibilitando seu uso na profilaxia e tratamento de doenças alérgicas como rinite e asma atópicas;
2. **PROTEÍNA RECOMBINANTE HIPOALERGÊNICA de acordo com a reivindicação 001, *caracterizada por*** uma sequência proteica de quatro peptídeos de Der p 1, quatro peptídeos de Der p 2 e um peptídeo de Der p 23 de regiões antigênicas de epítomos de Células T, além de dois ligante EAAAK, três ligantes KK, usados para separar os peptídeos entre os diferentes alérgenos ou para ligar peptídeos do mesmo alérgeno;
3. **PROTEÍNA RECOMBINANTE HIPOALERGÊNICA de acordo com as reivindicações 001 e 002, *caracterizada por*** sequências de peptídeos de epítomos de células T que possui modificações e ligações específicas *in silico* responsáveis pela redução na reatividade de IgE, quando comparadas com os alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 tipo-selvagem, representada pelas sequências de aminoácidos: SEQ ID N°. 1;
4. **PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HIPOALERGÊNICA de acordo com reivindicações 001 a 003, *caracterizado por*** compreender as seguintes etapas:
 - Revisão da literatura e seleção dos epítomos de células T já descritos;
 - Confirmação da reatividade desses epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 através do *IEDB analysis resource Consensus tool*;
 - Montagem *in silico* da proteína quimérica de epítomos de Células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23;
 - Modelagem da estrutura tridimensional de uma proteína quimérica em diferentes *softwares*;

- Desenho das sequências gênicas contendo os epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23;
- Método de obtenção da proteína híbrida hipoalergênica utilizando sistemas heterólogos;
- Síntese química das sequências gênicas codificadoras da proteína quimérica hipoalergênica e clonagem em vetor plasmidiano de expressão;
- Avaliação da utilização da proteína híbrida hipoalergênica recombinantes como moléculas de referência através de experimentos físico-químicos e imunológicos *in vitro* e *in vivo*;

5. **MÉTODO de acordo com reivindicação 004, caracterizado por** construção *in silico* de uma proteína híbrida hipoalergênica usando como molde sequências proteicas de regiões antigênicas de epítomos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23, através da determinação *in silico* de regiões de ligação a moléculas de MHC classe II do alérgeno Der p 1, Der p 2 e Der p 23 com intenção de manter e/ou aumentar a resposta celular e diminuir a resposta humoral mediada pela imunoglobulina IgE, bem como avaliação da estabilidade proteica das proteínas quiméricas hipoalergênicas, cuja sequencia codificadora otimizada identifica-se como SEQ ID N°.: 2;

6. **SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HIPOLAERGÊNICA de acordo com reivindicações 004 e 005, caracterizadas por** uma sequência de peptídeos de epítomos de células T mais ligantes específicos (SEQ ID N°.: 1, SEQ ID N°.: 2) servindo de molde para construção *in silico* da proteína quimérica hipoalergênica, a qual contém quatro peptídeos de Der p 1, quatro peptídeos de Der p 2, um peptídeo de Der p 23, dois ligante EAAAK e seis ligantes KK;

7. **MÉTODO de acordo com reivindicações 004 a 006, caracterizado por** presença de modificações específicas em relação a posição das sequências codificadoras da proteína quimérica hipoalergênica, com objetivo da expressão heteróloga das mesmas;

-
8. **MÉTODO de acordo com reivindicações 004 a 007, caracterizado pela** produção heteróloga da proteína quimérica hipoalergênica em células procariotas, eucariotas e/ou sistemas *cell-free*; abrange-se sistemas de expressão recombinante que envolvam a fusão dessas proteínas hipoalergênicas das SEQ ID N°.: 1, tal como suas variantes de acordo com as reivindicações 005 a 007, para permitir a expressão da versão recombinante da proteína hipoalergênica;
9. **MÉTODO de acordo com reivindicações 004 a 007, caracterizado por o** desenho do vetor de expressão conter unidade transcricional que incluem as sequências de nucleotídeos SEQ ID N°.: 2, tal como suas variantes de acordo com as reivindicações 005 a 007, para permitir a expressão da versão recombinante das proteínas híbridas tipo-selvagem e hipoalergênicas;
10. **MÉTODO de acordo com reivindicações 004 a 008 caracterizado por** produção recombinante da quiméricas hipoalergênica em sistemas heterólogos procarióticos, eucarióticos e/ou sistemas *in vitro* livres de células; inclui-se sistemas de produção recombinante que envolvam a fusão dessas proteínas híbridas das SEQ ID N°.: 1, com diferentes proteínas parceiras e/ou *tags*, além da alteração das sequências nucleotídicas SEQ ID N°.: 2, no intuito de purificar e/ou otimizar o processo de obtenção da versão recombinante, conforme requerido nas reivindicações 001 a 003;
11. **UMA VACINA PARA A IMUNOTERAPIA ALÉRGENO-ESPECÍFICA caracterizada por** utilização da proteína quimérica hipoalergênica na sua formulação, conforme solicitado nas reivindicações 001 a 003, apresentando o hipoalérgeno na sua forma purificada ou combinado a agentes excipientes e/ou adjuvantes;
12. **COMPOSIÇÃO VACINAL PARA A IMUNOTERAPIA ALÉRGENO-ESPECÍFICA de acordo com a reivindicação 009 caracterizada por** serem formuladas na forma de uma solução, suspensão, emulsão, liofilizada ou sistema transdérmico;
13. **COMPOSIÇÃO VACINAL PARA A IMUNOTERAPIA ALÉRGENO-ESPECÍFICA de acordo com a reivindicação 009 caracterizada por** administração

via subcutânea, sublingual, bucal, nasal, retal, tópica, por inalação, ou administração parentérica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo onde conseguimos destacar as diversas vantagens do uso de variantes hipoalergênicas recombinantes de alérgenos, mostrando o avanço de tecnologias mais seguras, eficazes e orientadas para o perfil individual de sensibilização alérgica do paciente. Mostramos também que construções de proteínas híbridas tem se destacado como uma abordagem promissora em AIT, pela simplificação da produção de proteínas recombinantes, já que uma única molécula será produzida contendo a informação imunológica relevante de alérgenos maiores de um ou mais organismos. Aumenta-se assim, o potencial imunogênico, possibilitando a exclusão ou inclusão de regiões conservadas de alérgenos. Essas vantagens provavelmente irão ajudar a contornar o problema dos protocolos de longo prazo em AIT, permitindo uma melhor adesão dos pacientes.

Constatamos que o híbrido rDer p 2231 estimulou em PBMCs isoladas de pacientes atópicos e de esplenócitos de camundongos tratados com rDer p 2231, produzindo níveis mais elevados de citocinas do perfil Th1 e citocinas reguladoras, bem como níveis mais baixos de citocinas do perfil Th2. Em modelo terapêutico com camundongos alérgicos a *D. pteronyssinus* tratado com a molécula híbrida, levou à redução da produção de IgE e menor atividade da peroxidase eosinofílica nas vias aéreas. Além desses achados, rDer p 2231 atuou no modelo crônico de alergia, reduzindo de forma significativa a hipertrofia da musculatura lisa, diminuindo a fibrose na membrana subbasal, a hiperplasia das células calciformes, assim como a resposta inflamatória alérgica, como hiperreatividade das vias aéreas.

Por fim, esses resultados mostram que rDer p 2231 foi capaz de reduzir a produção de IgE, induzindo anticorpos bloqueadores alérgeno-específicos, restaurando e equilibrando as respostas Th1/Th2 e levando a indução de células T reguladoras, além de reduzir os efeitos patológicos teciduais associados à asma crônica destacando esse híbrido hipoalergênico como um potente imunoterápico que poderia tratar pacientes co-sensibilizados aos três alérgenos maiores de *D. pteronyssinus*.

ANEXOS



870210038390



28/04/2021

12:35

29409161933093659

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 008111 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 15180714000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Augusto Viana s/n,

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40-110060

País: Brasil

Telefone: (71)32839097

Fax: (71)32839097

Email: inova@ufba.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Processo de construção e produção de proteína quimérica

Utilidade (54): recombinante hipoalergênica a partir de epítopos de células T dos alérgenos dos grupos 1, 2 e 23 do ácaro Dermatophagoides pteronyssinus, para uso profilático e tratamento de doenças alérgicas.

Resumo: A presente invenção trata-se de um polipeptídeo engenheirado a partir de sequência proteica de regiões antigênicas de epítopos de células T dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der p 23 do ácaro de poeira Dermatophagoides pteronyssinus para gerar uma molécula hipoalergênica, cujas sequências de aminoácidos e nucleotídeos estão apresentadas em SEQ ID N°.: 1 e SEQ ID N°.: 2, caracterizados por uma redução na reatividade de sIgE em soros de indivíduos alérgicos. Refere-se também aos métodos de produção, purificação e caracterização imunológica dessa molécula. Em modelo in vivo foi observado uma diminuição de sIgE e um aumento de sIgG1 e sIgG2a no soro, BAL e no pulmão de camundongos submetidos a um modelo de sensibilização, desafio e tratamento de alergia. Também foi observado uma redução de maneira significativa em comparação com o grupo controle positivo da atividade EPO no BAL e tecido pulmonar. Em modelo in vitro no que se refere a quantificação dos níveis de citocinas produzidas a partir da reestimulação de células em culturas de esplenócitos, observou-se uma redução nas respostas de citocinas das células Th2 (IL-4 e IL5), um aumento de Th1 (INF γ) e Treg (IL-10). Figura a publicar: 1 Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: André Garcez Ghirardi

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 76670414820

Endereço: RUA BASÍLIO DA GAMA,Nº 6

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40110-040

Telefone: 713283-9095

Fax:

Email: inova@ufba.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: ANTÔNIO MÁRCIO SANTANA FERNANDES

CPF: 04746837538

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Dr. Clemente Ferreira, 121, Apto 301, Canela, Salvador, Bahia,
Brasil

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40110-200

País: BRASIL

Telefone: (71) 991 311258

Fax:

Email: marciofernandes14@gmail.com

Inventor 2 de 5

Nome: EDUARDO SANTOS DA SILVA

CPF: 00821874527

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: 1ª Travessa Pirani, nº 3-E, Plataforma

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40717-546

País: BRASIL

Telefone: (71) 991 091529

Fax:

Email: eduardossilva06@gmail.com

Inventor 3 de 5

Nome: NEUZA MARIA ALCÂNTARA NEVES

CPF: 07064829568

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Pedro Lessa, nº 82, apt. 801, Canela, Salvador

Cidade: SALVADOR

Estado: BA

CEP: 40110-050

País: BRASIL

Telefone: (71) 988 588653

Fax:

Email: neuzalcantara@gmail.com

Inventor 4 de 5

Nome: LUIS GUSTAVO CARVALHO PACHECO

CPF: 01226612652

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Pedro Milton de Brito, 77, Barra.

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40140-630

País: BRASIL

Telefone: (71) 982 541659

Fax:

Email: luis.pacheco@ufba.br

Inventor 5 de 5

Nome: CARINA DA SILVA PINHEIRO

CPF: 04699216684

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Oito de Dezembro, 351, Apto 1102, Graça

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40150-000

País: BRASIL

Telefone: (71) 992 440108

Fax:

Email: carinasilvapinheiro@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	relatório_descritivo_patente_rDerp2231.pdf
Reivindicação	Reivindicações_patente_rDerp2231.pdf
Resumo	Resumo_patente_rDerp2231.pdf
Desenho	template_-_figuras_rDerp2231.pdf
Procuração	Procuração (Ghirard).pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.pgto.pdf

Sequências Biológicas

- Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	Sequencia.biologica.txt

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de A38C48E

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 05/11/2018

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.