

L'avenir des immunothérapies

J. Bousquet, P. Demoly

Service des maladies respiratoires, Inserm U454, hôpital Arnaud-de-Villeneuve, CHU, 34295 Montpellier cedex 5, France

Résumé

Le but des vaccins thérapeutiques (immunothérapie) est de diminuer les symptômes allergiques et les besoins médicamenteux nécessaires au contrôle de la rhinite et de l'asthme. Les vaccins thérapeutiques seraient susceptibles de modifier l'histoire naturelle de la maladie. Ils agissent en modifiant l'équilibre TH1-TH2. L'immunothérapie locale (sublinguale) apparaît très bien tolérée, même chez l'enfant. Les techniques d'immunisation par plasmide d'ADN semblent très prometteuses. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

immunothérapie / vaccins thérapeutiques / lymphocytes TH1 / lymphocytes TH2

Summary – The future of immunotherapy.

Therapeutic vaccines (immunotherapy) are aimed at decreasing the allergic symptoms and the amount of drugs required for the control of rhinitis and asthma. Therapeutic vaccines may also modify the natural history of the disease by modulating the TH1-TH2 equilibrium. Local (sublingual) immunotherapy appear to be safe even in children. DNA based immunisation appears highly promising. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

immunotherapy / therapeutic vaccines / TH1 lymphocytes / TH2 lymphocytes

L'immunothérapie spécifique est largement utilisée pour traiter les patients qui présentent une rhinite allergique, un asthme ou une réaction anaphylactique aux venins d'insectes [1]. Ces réactions allergiques sont médiées par des anticorps d'isotype IgE bien qu'elles impliquent des médiateurs de l'inflammation, qui ne sont pas spécifiques d'un antigène particulier. Le but de l'immunothérapie est d'améliorer les symptômes induits par la réaction allergique, de réduire les besoins thérapeutiques dans le cas de la rhinite et de l'asthme, mais aussi de modifier l'histoire naturelle de l'allergie [2]. Il a ainsi été décrit récemment que l'immunothérapie spécifique avait un effet prolongé, même après son arrêt [3].

L'immunothérapie spécifique n'est efficace que si les allergènes sont de grande qualité et standardisés, et si les doses administrées sont suffisamment élevées. Par voie injectable, l'immunothérapie spécifique peut

entraîner l'apparition de réactions secondaires, que l'on essaie de réduire en modifiant des allergènes.

Lors de la réunion de l'OMS qui s'est tenue en 1997 sur l'immunothérapie, on a proposé de remplacer le terme par « vaccination thérapeutique » [1]. En effet, les vaccins sont utilisés en médecine comme des immunomodulateurs, de même que l'immunothérapie spécifique. Actuellement, un certain nombre de maladies sont liées à un déséquilibre entre les lymphocytes Th1 et Th2. Il s'agit du diabète, de la sclérose en plaques ou d'autres maladies auto-immunes [4-6]. Ainsi, on a proposé un concept unifié de vaccin thérapeutique pour tout traitement qui intervient au niveau de la balance Th1-Th2.

De nombreux allergènes majeurs ont été clonés [7], les épitopes importants ont été identifiés et des allergènes modifiés sont disponibles [8]. La technologie des allergènes recombinants permet l'obtention de

quantités importantes d'allergènes purs pour le diagnostic et le traitement de l'allergie [9]. Des méthodes d'immunothérapie spécifique et non spécifiques ont été ainsi proposées [10, 11].

MÉCANISMES DE L'IMMUNOTHÉRAPIE SPÉCIFIQUE

Jusqu'en 1980, on pensait que l'immunothérapie spécifique agissait par le biais d'anticorps bloquants d'isotypes IgG, mais on a observé depuis que ce traitement intervient en modifiant l'équilibre Th1-Th2. Il s'agit soit d'une anergie vraie ou simplement d'une commutation des lymphocytes Th2 vers les Th1 ou Th0 [12-16]. Cela n'est pas encore parfaitement élucidé. L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, pourrait avoir un effet important [17].

Toute intervention thérapeutique qui module la balance Th1-Th2 ou qui induit une augmentation de l'IL-10 pourrait avoir un effet important dans le traitement des maladies allergiques.

Par ailleurs, l'immunothérapie spécifique réduit l'inflammation allergique au niveau des organes cibles comme les bronches ou le nez en diminuant le nombre de cellules inflammatoires et la libération de médiateurs pro-inflammatoires [18, 19].

LIENS ENTRE ASTHME ET RHINITE

Bien que tous les patients allergiques ne développent pas un asthme, il existe une corrélation étroite entre asthme et rhinite. Plus de 70 % des asthmatiques présentent une rhinite, alors que seulement 20 à 30 % des patients présentant une rhinite ont aussi de l'asthme [20]. L'immunothérapie spécifique est l'un des seuls traitements à pouvoir à la fois améliorer les symptômes bronchiques et ORL, alors que la plupart des traitements efficaces sont administrées par voie locale. C'est le cas en particulier de la corticothérapie.

APPROCHE THÉRAPEUTIQUE POUR UN NOUVEAU VACCIN DANS L'ALLERGIE MÉDIÉE PAR LES IgE

Voie locale

De nouvelles routes d'administration de l'immunothérapie sont actuellement à explorer. Il s'agit de la

voie nasale, sublinguale ou orale, utilisant de fortes doses d'allergènes [1]. Alors que ces voies n'avaient pas montré leur efficacité lorsque les doses d'allergènes étaient similaires à celles administrées par voie injectable, il apparaît que l'immunothérapie sublinguale à doses élevées entraîne une amélioration des symptômes de rhinoconjonctivite [21-27]. Les travaux sur l'asthme ne sont pas encore totalement concluants, car trop peu nombreux [28-30]. Ce traitement est non seulement efficace, mais il est en général bien toléré [31] et peut donc être facilement administré chez l'enfant.

Les mécanismes d'action de traitements par voie locale font appel à des mécanismes systémiques puisque l'on retrouve la stimulation d'anticorps d'isotype IgE et IgG lors de la désensibilisation sublinguale ou nasale [28], réduisent l'inflammation, mais pourraient aussi avoir des effets spécifiques locaux. En effet, il existe un grand nombre de cellules dendritiques sous le plancher de la langue, qui pourraient expliquer une très bonne présentation de l'allergène [32]. Le rôle de l'immunothérapie sublinguale au niveau des lymphocytes T1 et Th2 doit être mieux documenté.

Nouvelles méthodes de délivrance des vaccins allergéniques

De nombreux vaccins composés de sous-unités d'antigènes hautement purifiés, synthétiques ou recombinants, sont actuellement testés. Ces vaccins pourraient être mieux tolérés, mais semblent être moins immunogéniques. Il convient donc d'ajouter des adjuvants immunologiques pour augmenter la réponse spécifique immune [33]. Plusieurs types d'adjuvants ont été proposés, mais ils sont souvent toxiques. Ils peuvent augmenter la demi-vie immunologique des vaccins, augmenter la présentation de l'antigène, induire la production de cytokines immunomodulatrices.

Par exemple, des parois de bactéries Gram positives peuvent entraîner une immunisation de type Th1, en utilisant l'allergène majeur du pollen de bouleau (Bet v1) [34]. De nombreux travaux sont actuellement effectués, avec des sous-unités de la toxine cholérique et il pourrait s'agir d'un effet fort important, car on a pu dissocier l'effet toxique de l'effet immunogène [35].

Enfin, on peut modifier la forme galénique et proposer, par exemple, des liposomes d'allergènes [36-38], mais les résultats cliniques ne sont pas encore probants.

Les alléroïdes

Les alléroïdes sont des allergènes chimiquement modifiés qui cherchent à réduire l'allergénicité (réduction des réactions secondaires) tout en préservant l'antigénicité (efficacité de la vaccination). Ces alléroïdes peuvent être préparés par polymérisation par du formaldéhyde ou du glutaraldéhyde [39-42]. Plusieurs études cliniques ont montré l'efficacité de cette méthode et ces allergènes sont commercialisés dans plusieurs pays.

Immunomodulation des lymphocytes T

Il existe deux types d'épitopes au niveau des allergènes. Les épitopes T sont dits séquentiels et comportent de sept à 12 acides aminés. Ils sont reconnus comme structure linéaire par les récepteurs des lymphocytes T. Les épitopes B sont structuraux et sont en général reconnus par les immunoglobulines circulantes ou fixées aux cellules, par exemple les IgE sur les mastocytes et lymphocytes B. Ainsi, les épitopes B sont anaphylactogènes car ils peuvent induire l'activation des mastocytes et les épitopes T sont immunogènes car ils activent les lymphocytes T. On a donc tenté depuis quelques années de réduire le potentiel anaphylactogène des allergènes sans modifier leur potentiel immunogène.

Les lymphocytes T étant les cellules régulatrices essentielles de la synthèse des IgE, plusieurs approches ont été proposées pour modifier la réactivité des lymphocytes T et induire une réponse Th-1.

Il peut s'agir :

- d'isoformes non anaphylactiques d'allergènes : grâce aux techniques de biologie moléculaire et de clonage, on a pu obtenir des allergènes recombinants purifiés en grande quantité, et les modifier pour les rendre moins allergéniques [43, 44]. On peut, par exemple, par mutagenèse dirigée [45-48], modifier un ou deux acides aminés, ce qui fait perdre à la structure de l'allergène sa conformation tertiaire et ainsi les épitopes B ne sont plus reconnus. Ces aller-

gènes ont perdu la capacité d'entraîner des tests cutanés positifs, mais ont toujours une activité immunogène [49] ;

- altération de la structure tertiaire des allergènes : des progrès récents ont permis d'obtenir la structure tridimensionnelle d'allergènes majeurs et la localisation des épitopes [50, 51]. On peut ainsi, par modélisation moléculaire, arriver à obtenir des allergènes non anaphylactogènes mais qui possèdent toujours leur activité immunogène [52] ;

- les peptides des épitopes T : la possibilité d'obtenir des matériaux purifiés ou synthétiques, avec des séquences peptidiques, a permis d'analyser les séquences minimales de peptide qui peuvent entraîner l'activation des lymphocytes T [53]. Ces peptides n'entraînent pas d'histaminolibération *in vivo* ou *in vitro*, mais sont capables de stimuler les lymphocytes T [54, 55]. De nombreuses études ont été réalisées avec des peptides T de chat et d'Ambrosia et des résultats cliniques ont été publiés [56-59]. Il semble que ces peptides entraînent un *switch* Th2-Th0 [60], mais ils entraînent aussi des réactions systémiques non immédiates [61], dont les mécanismes sont mal connus. Leur efficacité n'était que modeste. Le développement a été arrêté par l'entreprise Immuno-Logic, mais est repris depuis environ six mois par AB Kay.

Complexes antigène-anticorps

Le réseau idotype anti-idotype est une méthode élégante pour réduire la réponse à IgE. Des études effectuées en Belgique et au Canada suggèrent que cette approche pourrait être efficace et bien tolérée. C'est en particulier le cas pour l'allergie aux acariens de la poussière de maison et aux pollens de graminées [62-65]. L'industrialisation de cette méthodologie n'est pas évidente cependant.

Haptène non réactif des IgE des allergènes majeurs

La désensibilisation hapténique avait été proposée pour la pénicilline, mais ne s'était pas révélée très efficace, car certains patients réagissent encore aux haptènes et non aux haptènes combinés. Cette technique a été reprise pour les allergènes majeurs de

graminées [66], au moyen de la technique du recouvrement d'épitopes et d'analyse structurale [51]. Des haptènes non anaphylactogéniques liant les IgE pourraient être utilisés pour la saturation de cellules effectrices.

Immunisation par plasmide d'ADN

En quelques années, la vaccination génétique par injection de plasmide d'ADN pour entraîner une réponse immune in vivo a été développée d'une observation intéressante à une stratégie vaccinale viable. L'ADN contient l'information génétique d'un organisme mais aussi des séquences immunogènes (*immunostimulatory DNA sequences* : ISS). Les mammifères réagissent fortement aux ISS bactériens qui peuvent ainsi servir d'adjuvants puissants entraînant une réponse Th1 envers l'allergène auquel est couplé l'ISS. Après des études multiples, on a pu déterminer que des hexamères contenant des dinucléotides CpG possédaient l'efficacité des ISS. Cependant, d'autres structures sont aussi des ISS.

Les ISS ont des applications en cancérologie, en pathologie infectieuse et en allergologie. L'immunisation par ADN consiste à administrer un plasmide bactérien qui code pour l'allergène contenant des ISS. Elle induit une forte réaction primaire de type Th1 vis-à-vis de l'allergène, alors que la protéine entière entraîne une réponse Th2 pour le même allergène [67-69]. Cette même technique permet aussi de moduler la réponse secondaire à l'allergène en entraînant une inhibition de la réponse Th2 au niveau des réponses lymphocytaires [70] mais aussi pour l'inflammation à éosinophiles [71]. Des immunisations par voie muqueuse sont possibles et, chez la souris entraînent aussi une immunisation de type Th1 [72].

Plus récemment, on a couplé l'ISS avec l'allergène majeur de l'Ambrosia (Amb a1), la vaccination génétique n'ayant alors qu'un rôle d'adjuvant Th1 (73). L'application à l'homme est en cours.

Les effets secondaires sont encore mal appréciés. Peut-il exister une réponse vers le système Th1 ou une inflammation locale importante ?

Vaccination avec un décapeptide du fragment Fc de l'IgE

Stanworth [74] avait proposé d'utiliser une vaccination avec un décapeptide du fragment Fc de l'IgE et avait montré, chez la souris, une efficacité certaine.

Nous avons recherché dans l'allergie au pollen de cyprès si cette technique était efficace chez l'homme, mais elle n'a montré aucune amélioration par rapport au placebo.

PEUT-ON PRÉVENIR L'ALLERGIE PAR UN VACCIN BACTÉRIEN OU VIRAL ?

Depuis environ dix ans, à la suite de Holt, certains considèrent que l'allergie est liée, au moins pour partie, à un défaut de stimulation des lymphocytes Th1 lors des premiers mois de la vie [75]. Cette théorie a beaucoup évolué et aujourd'hui on pense qu'une immunisation précoce par le bacille de la tuberculose [76, 77] ou des virus comme celui des oreillons [78] serait capable de prévenir l'allergie. Cependant, des études négatives ont aussi été rapportées [79-81]. Ainsi, il n'est pas encore certain que l'infection précoce ou une immunisation précoce puisse prévenir l'apparition de l'allergie.

RÉFÉRENCES

- 1 Bousquet J, Lockey R, Malling H. WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998 ; 53 Suppl. 54 : 44 : 4-42.
- 2 Des-Roches A, Paradis L, Ménardo JL, Bouges S, Daurès JP, Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997 ; 99 : 450-3.
- 3 Durham SR, Walker SM, Varga EM, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy [see comments]. *N Engl J Med* 1999 ; 341 : 468-75.
- 4 Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995 ; 16 : 34-8.
- 5 Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, et al. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in non-obese diabetic mice. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 87-99.
- 6 O'Garra A, Steinman L, Gijbels K. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1997 ; 9 : 872-83.
- 7 Scheiner O, Kraft D. Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy* 1995 ; 50 : 384-92.
- 8 Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Curr Opin Immunol* 1995 ; 7 : 751-6.
- 9 van Ree R. Analytic aspects of the standardization of allergenic extracts. *Allergy* 1997 ; 52 : 795-805.
- 10 Valenta R, Almo S, Ball T, Dolecek C, Steinberger P, Laffer S, et al. The immunoglobulin E-allergen interaction: a target for therapy of type I allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 1998 ; 116 : 167-76.
- 11 Smith A, Chapman M. Allergen specific immunotherapy: new strategies using recombinant allergens. In: Yssel JBaH, ed. *Immunotherapy in asthma*. New York: Marcel Dekker; 1998.

- 12 Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 2123-30.
- 13 Varney VA, Hamid QA, Gaga M, Ying S, Jacobson M, Frew AJ, et al. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* 1993 ; 92 : 644-51.
- 14 McHugh SM, Deighton J, Stewart AG, Lachmann PJ, Ewan PW. Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1995 ; 25 : 828-38.
- 15 Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995 ; 154 : 4187-94.
- 16 Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, et al. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol* 1996 ; 97 : 1356-65.
- 17 Akdis CA, Blaser K. IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *Faseb J* 1999 ; 13 : 603-9.
- 18 Hedlin G, Silber G, Naclerio R, Proud D, Lamas AM, Eggleston P, et al. Comparison of the in-vivo and in-vitro response to ragweed immunotherapy in children and adults with ragweed-induced rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1990 ; 20 : 491-500.
- 19 Bousquet J, Becker WM, Hejjaoui A, Cour P, Chanal I, Lebel B, et al. Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double-blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with standardized extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1991 ; 88 : 43-53.
- 20 Leynaert B, Bousquet J, Neukirch C, Liard R, Neukirch F. Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in non-atopic subjects. Results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 104 : 301-4.
- 21 Malling HJ, Abreu-Nogueira J, Alvarez-Cuesta E, Björkstén B, Bousquet J, Caillot D, et al. Local immunotherapy. *Allergy* 1998 ; 53 : 933-44.
- 22 Clavel R, Bousquet J, Andre C. Clinical efficacy of sublingual-swallow immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled trial of a standardized five-grass-pollen extract in rhinitis. *Allergy* 1998 ; 53 : 493-8.
- 23 Hordijk GJ, Antvelink JB, Luwema RA. Sublingual immunotherapy with a standardised grass pollen extract; a double-blind placebo-controlled study. *Allergol Immunopathol* 1998 ; 26 : 234-40.
- 24 Horak F, Stubner P, Berger UE, Marks B, Toth J, Jager S. Immunotherapy with sublingual birch pollen extract. A short-term double-blind placebo study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1998 ; 8 : 165-71.
- 25 La Rosa M, Ranno C, Andri C, Carat F, Tosca MA, Canonica GW. Double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual-swallow immunotherapy with standardized *Parietaria judaica* extract in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 104 : 425-32.
- 26 Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998 ; 351 : 629-32.
- 27 Purello-D'Ambrosio F, Gangemi S, Isola S, La Motta N, Puccinelli P, Parmiani S, et al. Sublingual immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled trial with *Parietaria judaica* extract standardized in mass units in patients with rhinoconjunctivitis, asthma, or both. *Allergy* 1999 ; 54 : 968-73.
- 28 Bousquet J, Scheinmann P, Guinnee MT, Perrin-Fayolle M, Sauvaget J, Tonnel AB, et al. Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in patients with asthma due to house-dust mites: a double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 1999 ; 54 : 249-60.
- 29 Vourdas D, Syrigou E, Potamianou P, Carat F, Batard C, André C, et al. Double-blind, placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardized olive pollen extract in pediatric patients with allergic rhinoconjunctivitis and mild asthma due to olive pollen sensitization. *Allergy* 1998 ; 53 : 662-72.
- 30 Mungan D, Misirligil Z, Gurbuz L. Comparison of the efficacy of subcutaneous and sublingual immunotherapy in mite-sensitive patients with rhinitis and asthma. A placebo controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999 ; 82 : 485-90.
- 31 Andre C, Vatrinet C, Galvain S, Carat F, Sicard H. Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children and adults. *Int Arch Allergy Immunol* 2000 ; 121 : 229-34.
- 32 Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Asieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995 ; 154 : 5071-9.
- 33 Vogel FR. Adjuvants in perspective. *Dev Biol Stand* 1998 ; 92 : 241-8.
- 34 Jahn-Schmid B, Graninger M, Glozik M, Kupcu S, Ebner C, Unger FM, et al. Immunoreactivity of allergen (Bet v 1) conjugated to crystalline bacterial cell surface layers (S-layers). *Immunotechnology* 1996 ; 2 : 103-13.
- 35 Agren LC, Ekman L, Lowenadler B, Lycke NY. Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *J Immunol* 1997 ; 158 : 3936-46.
- 36 Walls AF. Liposomes for allergy immunotherapy? [editorial]. *Clin Exp Allergy* 1992 ; 22 : 1-2.
- 37 McWilliam AS, Stewart GA. Production of multilamellar, small unilamellar and reverse-phase liposomes containing house dust mite allergens. Potential adjuvants in the immunotherapy of allergic disease. *J Immunol Methods* 1989 ; 121 : 53-60.
- 38 Genin I, Barratt G, Tran XT, Delattre J, Puisieux F. Optimization and characterization of freeze-dried multilamellar liposomes incorporating different standardized allergen extracts. *Allergy* 1994 ; 49 : 645-52.
- 39 Marsh DG, Norman PS, Roebber M, Lichtenstein LM. Studies on allergoids from naturally occurring allergens. III. Preparation of ragweed pollen allergoids by aldehyde modification in two steps. *J Allergy Clin Immunol* 1981 ; 68 : 449-59.
- 40 Patterson R, Suszko IM, Bacal E, Zeiss CR, Kelly JF, Pruzansky JJ. Reduced allergenicity of high molecular weight ragweed polymers. *J Allergy Clin Immunol* 1979 ; 63 : 47-50.
- 41 Bousquet J, Maasch HJ, Hejjaoui A, et al. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. III. Efficacy and safety of unfractionated and high-

- molecular-weight preparations in rhinoconjunctivitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989 ; 84 : 546-56.
- 42 Grammer LC, Shaughnessy MA, Shaughnessy JJ, Silvestri L, Patterson R. Allergenicity, immunogenicity, and safety of immunotherapy with various molecular weight ranges of polymerized ragweed. *J Allergy Clin Immunol* 1985 ; 76 : 195-200.
 - 43 Ferreira F, Ebner C. Isoforms of atopic allergens with reduced allergenicity but conserved T cell antigenicity: possible use for specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 1997 ; 113 : 125-7.
 - 44 Ferreira F, Hirtenlehner K, Jilek A, et al. Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J Exp Med* 1996 ; 183 : 599-609.
 - 45 Smith AM, Chapman MD. Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen Der p 2. *Mol Immunol* 1996 ; 33 : 399-405.
 - 46 Noguchi E, Shibasaki M, Nishiyama C, Okumura Y, Takita H. IgE responsiveness to *Dermatophagoides farinae* in young asthmatic children: IgE binding study using recombinant allergens of Der f1, Der f2 and mutant proteins of Der f2. *Int Arch Allergy Immunol* 1996 ; 110 : 380-7.
 - 47 Ferreira F, Ebner C, Kramer B, Casari G, Briza P, Kungl AJ, et al. Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *Faseb J* 1998 ; 12 : 231-42.
 - 48 Hakkaart GA, Aalberse RC, van-Ree R. Epitope mapping of the house-dust-mite allergen Der p 2 by means of site-directed mutagenesis. *Allergy* 1998 ; 53 : 165-72.
 - 49 Pauli G, Purohit A, Oster J, De Blay F, Vratla S, Niederberger V, et al. Comparison of genetically engineered hypoallergenic rBet v1 derivatives with rBet v1 wild-type by prick test and intradermal testing : results obtained in a French population. *Clin Exp Allergy* 2000 ; 30 : 1076-85.
 - 50 Gajhede M, Osmark P, Poulsen F, Ipsen A, Larsen JN, Joost Van Neerven RJ, et al. X-ray and NMR structure of Bet v1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Struct Biol* 1996 ; 3 : 1040-4.
 - 51 Fedorov AA, Ball T, Mahoney N, Valenta R, Almo S. Crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin: Molecular basis for allergen cross-reactivity. *Structure* 1997 ; 5 : 33-45.
 - 52 Vrtala S, Hirtenlehner K, Vangelista L, Pastor EA, Eichler HG, Speer WR, et al. Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v1, into two non-anaphylactic T cell epitope-containing fragments; candidates for a novel form of immunotherapy. *J Clin Invest* 1997 ; 99 : 1673-81.
 - 53 Yssel H, Fasler S, Lamb J, de Vries JE. Induction of non-responsiveness in human allergen-specific type 2 T helper cells. *Curr Opin Immunol* 1994 ; 6 : 847-52.
 - 54 Briner TJ, Kuo MC, Keating KM, Rogers BL, Greenstein JL. Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 7608-12.
 - 55 Hoyne GF, Callow MG, Kuo MC, Thomas WR. Characterization of T-cell responses to the house dust mite allergen Der p II in mice. Evidence for major and cryptic epitopes. *Immunology* 1993 ; 78 : 65-73.
 - 56 Morgenstern JP, Griffith IJ, Brauer AW, Rogers BL, Bond JF, Chapman MD, et al. Amino acid sequence of Fel dI, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 9690-4.
 - 57 Rogers BL, Morgenstern JP, Garman RD, Bond JF, Kuo MC. Recombinant Fel d.I: Expression, purification, IgE binding and reaction with cat-allergic human T cells. *Mol Immunol* 1993 ; 30 : 559-68.
 - 58 Nicodemus C, Philip G, Jones N, Hirani S, Norman P. Integrated clinical experience with tolerogenic peptides. *Int Arch Allergy Immunol* 1997 ; 113 : 326-8.
 - 59 Norman PS, Nicodemus CF, Creticos PS, Wood RA, Eggleston PA, Lichtenstein LM, et al. Clinical and immunologic effects of component peptides in Allervax Cat. *Int Arch Allergy Immunol* 1997 ; 113 : 224-6.
 - 60 Pène J, des Roches A, Paradis L, Lebel B, Farce M, Nicodemus CF. Immunotherapy with Fel d 1 peptides decreases IL-4 release by peripheral blood T cells of cat-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1998 ; 102 : 571-8.
 - 61 Aaronson D, Umetsu DT. The safety and efficacy of allervax cat in cat allergic patients. *Clin Immunol* 1999 ; 93 : 222-31.
 - 62 Machiels JJ, Buche M, Somville MA, Jacquemin MG, Saint-Remy JM. Complexes of grass pollen allergens and specific antibodies reduce allergic symptoms and inhibit the seasonal increase of IgE antibody. *Clin Exp Allergy* 1990 ; 20 : 653-60.
 - 63 Machiels JJ, Somville MA, Lebrun PM, Lebecque SJ, Jacquemin MG, Saint-Remy JM. Allergic bronchial asthma due to *Dermatophagoides pteronyssinus* hypersensitivity can be efficiently treated by inoculation of allergen-antibody complexes. *J Clin Invest* 1990 ; 85 : 1024-35.
 - 64 Machiels JJ, Somville MA, Jacquemin MG, Saint-Remy JM. Allergen-antibody complexes can efficiently prevent seasonal rhinitis and asthma in grass pollen hypersensitive patients. Allergen-antibody complex immunotherapy. *Allergy* 1991 ; 46 : 335-48.
 - 65 Machiels JJ, Lebrun PM, Jacquemin MG, Saint-Remy JM. Significant reduction of nonspecific bronchial reactivity in patients with *Dermatophagoides pteronyssinus*-sensitive allergic asthma under therapy with allergen-antibody complexes. *Am Rev Respir Dis* 1993 ; 147 : 1407-12.
 - 66 Ball T, Vrtala S, Sperr WR, Valent P, Susani M, Kraft D, et al. Isolation of an immunodominant IgE hapten from an epitope expression cDNA library. Dissection of the allergic effector reaction. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 28323-8.
 - 67 Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudley JA, Roman M, et al. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 5141-5.
 - 68 Spiegelberg HL, Raz E. DNA vaccines. *Allergy* 1999 ; 56 : 47-8.
 - 69 Van Uden J, Raz E. Immunostimulatory DNA and applications, to allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 104 : 902-10.
 - 70 Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Lay YL, Whu HD, Huang SK, et al. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nature Med* 1996 ; 2 : 540-4.
 - 71 Broide D, Raz E. DNA-Based immunization for asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999 ; 118 : 453-6.
 - 72 Horner AA, Raz E. Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide: A novel mucosal adjuvant. *Clin Immunol* 2000 ; 95 : S19-29.
 - 73 Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Vannest G, Tuck S, Eiden JJ, et al. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen Amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ; 106 : 124-34.

- 74 Stanworth DR, Jones VM, Lewin IV, Nayyar S. Allergy treatment with a peptide vaccine. *Lancet* 1990 ; 336 : 1279-81.
- 75 Holt PG. A potential vaccine strategy for asthma and allied atopic diseases during early childhood. *Lancet* 1994 ; 344 : 456-8.
- 76 Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997 ; 275 : 77-9.
- 77 von Mutius E, Pearce N, Beasley R, Cheng S, von Ehrenstein O, Björkstén B, et al. International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. *Thorax* 2000 ; 55 : 449-53.
- 78 Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996 ; 347 : 1792-6.
- 79 Alm JS, Lilja G, Pershagen G, Scheynius A. Early BCG vaccination and development of atopy. *Lancet* 1997 ; 350 : 400-3.
- 80 Omenaas E, Jentoft HF, Vollmer WM, Buist AS, Gulsvik A. Absence of relationship between tuberculin reactivity and atopy in BCG vaccinated young adults. *Thorax* 2000 ; 55 : 454-8.
- 81 Paunio M, Heinonen OP, Virtanen M, Leinikki P, Patja A, Peltola H. Measles history and atopic diseases: a population-based cross-sectional study. *JAMA* 2000 ; 283 : 343-6.