



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique xxx (2007) xxx–xxx

REVUE FRANÇAISE
D'ALLERGOLOGIE
ET D'IMMUNOLOGIE CLINIQUE

<http://france.elsevier.com/direct/REVCLI/>

Allergènes recombinants et immunothérapie Recombinant allergens and immunotherapy

G. Pauli

*Département de pneumologie, faculté de médecine, université Louis-Pasteur, hôpital Lyautey, hôpitaux universitaires de Strasbourg,
BP 426, 67091 Strasbourg cedex, France*

Résumé

La mise au point de nouvelles techniques de désensibilisation utilisant des produits issus de la biologie moléculaire nécessite le contrôle de leur efficacité par des essais cliniques appropriés. Un aperçu des principales molécules proposées par les recherches fondamentales au cours des dernières années est délivré : allergènes recombinants correspondant à des molécules d'allergènes pertinents du fait de leur forte prévalence de sensibilisation, dérivés hypoallergéniques d'allergènes recombinants (polymères, fragments, molécules avec des mutations ou des délétions d'acides aminés), molécules hybrides, épitopes T, épitopes B, molécules conjuguées à des CpG ou d'autres co-stimulateurs. L'activité biologique d'un grand nombre de ces molécules a été démontrée in vivo. La sélection de molécules candidates pour l'immunothérapie a d'abord comporté des études préliminaires effectuées en ouvert sur un nombre restreint de patients. Les auteurs rapportent ici les résultats de cinq études de désensibilisations effectuées par injection, réalisées en double insu, le groupe témoin étant un placebo et/ou un groupe traité par l'extrait naturel (dans deux études). Les résultats cliniques les plus significatifs sur le plan statistique ont été observés avec des allergènes recombinants non modifiés, sans survenue d'accidents systémiques sévères. Dans les cinq études, on relève une augmentation importante des IgG spécifiques vis-à-vis de l'allergène naturel et vis-à-vis des allergènes recombinants. La réduction des tests cutanés dans les groupes traités par rapport au groupe placebo est significative dans deux études sur trois. Des études comportant un nombre de patients plus important sont maintenant souhaitables pour répondre aux exigences réglementaires du développement clinique des allergènes recombinants.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The development of new immunotherapy techniques using products produced by molecular biology requires that their efficacy be controlled by appropriate clinical trials. An outline of the principal molecules derived through fundamental research during the past few years will include recombinant allergens corresponding to natural allergens that are pertinent because of their high prevalence of sensitivity, hypoallergenic derivatives of recombinant allergens (polymers, fragments, molecules with mutations or amino acid deletions), hybrid molecules, T-cell epitopes, B-cell epitopes, and molecules conjugated with CpG or other co-stimulants. The biological activity of a large number of these molecules has been demonstrated in vivo. The selection of candidate molecules for immunotherapy will depend first of all on the results of preliminary open studies on a limited number of patients. Here, we report the results of five double blind immunotherapy studies, in which the control group received placebo, and in two studies another group was treated with natural extract. The most statistically significant clinical results were observed with unmodified recombinant allergens, without occurrence of severe systemic reactions. In these five studies, there was a significant increase in the level of specific IgG with the natural allergen and with the recombinant allergens. Decrease in skin test responses in the treated groups relative to the placebo group was significant in two of the three studies. Studies including a greater number of patients are now needed to meet the demands of regulatory requirements for clinical development of recombinant allergens.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Désensibilisation ; Allergènes ; Allergènes recombinants ; Immunothérapie

Keywords: Recombinant allergens; Immunotherapy; Allergens

1. Introduction

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de cloner et de séquencer plusieurs centaines d'allergènes différents, et

Adresse e-mail : gabrielle.pauli@chru-strasbourg.fr.

leur caractérisation moléculaire a permis une meilleure compréhension des réponses immunitaires IgE médiées. La mise à disposition de ces molécules allergéniques a permis d'étudier leur intérêt pour le diagnostic allergologique, en déterminant le spectre de spécificité des IgE spécifiques des patients [1]. Leur emploi pour l'immunothérapie spécifique peut offrir de nombreux avantages par rapport aux extraits allergéniques actuellement disponibles : leur pureté s'apparente aux produits pharmaceutiques, leur concentration en valeur absolue est envisageable, rendant caduque les problèmes de standardisation. La composition d'un extrait d'allergènes recombinants est limitée aux seules protéines allergéniques contrairement aux extraits actuels qui peuvent contenir des protéines allergéniques auxquelles le patient n'est pas sensibilisé, des protéines non allergéniques, des endotoxines. Des recherches intensives ont été effectuées au cours des 15 dernières années pour mettre au point des dérivés d'allergènes recombinants ayant une activité allergénique réduite ou des molécules conjuguées pouvant intervenir dans l'immunomodulation des réactions allergiques [2].

2. Aperçu des principales recherches pour l'obtention de nouveaux vaccins destinés à l'immunothérapie [3]

La technique de production des allergènes recombinants permet d'obtenir des molécules équivalentes aux molécules purifiées naturelles. Ces allergènes recombinants ont les mêmes épitopes B et T que les molécules naturelles. Les systèmes d'expression utilisant *E. coli* sont particulièrement adaptés aux molécules non glycosylées ou aux molécules où la glycosylation n'est pas indispensable pour la réactivité avec les IgE. Les protéines glycosylées peuvent être produites dans d'autres systèmes (levures, cellules d'insectes, feuilles de tabac). Pour l'utilisation en clinique, les allergènes recombinants doivent être produits sous des conditions appropriées GMP (*Good Medical Practice*) et selon les guidelines de l'ICH (*International Conference of Harmonisation*) [4].

Des molécules hybrides correspondant à deux ou plusieurs allergènes peuvent être générées par les techniques de biologie moléculaire [5]. Ces molécules hybrides ont souvent des propriétés immunologiques différentes de l'allergène naturel en induisant une importante stimulation des cellules T et un taux élevé d'IgG spécifiques [6]. Pour les pollens de graminées, une molécule hybride associant Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 et Phl p 6 a démontré de telles propriétés chez l'animal [7] et son activité biologique chez l'homme a été démontrée par des tests cutanés et des tests d'histaminolibération réalisés chez des patients sensibilisés aux graminées [8].

La recherche de dérivés d'allergènes recombinants ayant une activité réduite s'est orientée vers différents axes :

- Utilisation de peptides recombinants correspondant seulement aux épitopes T pour l'allergène majeur de chat et Der p 1 [9,10,11,12], diminution plus ou moins importante des épitopes B en utilisant des fragments d'allergènes [13] ;
- Délétion ou mutation ponctuelle pour modifier les épitopes B conformationnels les plus importants. Cette dernière

approche a été utilisée pour différentes molécules allergéniques : pour les graminées [14,15], pour le pollen de bouleau [16], pour la pariétaire [17], le latex [18], la phospholipase de venin [19], le chat [20] et même des allergènes alimentaires [21]. Certaines études ont vérifié la persistance de la structure tridimensionnelle après mutation de quelques acides aminés, ce qui est suffisant pour modifier la topographie de la surface de contact avec les IgE mais préserve les structures générant les réponses IgG [16].

La plupart de ces molécules ont démontré la conservation de leur immunogénicité (stimulation des clones de cellules T provenant de sujets sensibilisés à l'allergène naturel) et la réduction de leur capacité à se lier avec les IgE spécifiques. Dans une étude effectuée avec des fragments de Bet v 1, les tests cutanés effectués avec les molécules hypoallergéniques chez des sujets sensibilisés montraient une importante diminution de la réaction immédiate [22,23].

Des peptides dérivés des épitopes B ayant une longueur de 20 à 40 acides aminés ont également été utilisés [24] en expérimentation animale ; leur potentiel de production d'IgG spécifiques ayant pour but l'inhibition de la dégranulation mastocytaire.

Des vaccins utilisant l'ADN codant pour les allergènes recombinants sont préférés à ceux utilisant l'ADN des allergènes naturels susceptibles d'entraîner des réactions allergiques [25].

Des conjugaisons d'allergènes purifiés avec un composé ayant une activité co-stimulatrice ont également été utilisées. La conjugaison d'Amb a 1 (allergène majeur de l'ambrosie) et du CpG ADN (séquences de 6 paires de bases (5'purine-purine-CpG-pyrimidine-pyrimidine) entraîne la production de cytokine Th1, inhibe la réponse Th2 et paraît être un excellent candidat pour le traitement de l'inflammation allergique [26,27].

La conjugaison de Bet v 1 avec des gènes codant pour une protéine de surface d'une bactérie (*Geobacillus stearothermophilus*) entraîne dans le système utilisé une diminution de l'histaminolibération des basophiles et un maintien de l'activité stimulatrice T avec augmentation de la production de cytokines de type Th1 [28].

Enfin, la fusion chimérique de Fel d 1 avec la portion tronquée d'une IgG incluant le récepteur Fcγ permet d'obtenir une molécule qui inhibe l'activation des récepteurs Fcε1, et de ce fait, inhibe l'anaphylaxie cutanée passive chez la souris transgénique qui exprime le récepteur Fcε [29].

La Fig. 1 représente schématiquement les principaux axes de recherche concernant la mise au point de nouvelles molécules destinées à l'immunothérapie.

3. Résultat des études cliniques

3.1. Études préliminaires

Les travaux expérimentaux effectués chez l'animal, ainsi que les études cliniques utilisant des sérum de sujets

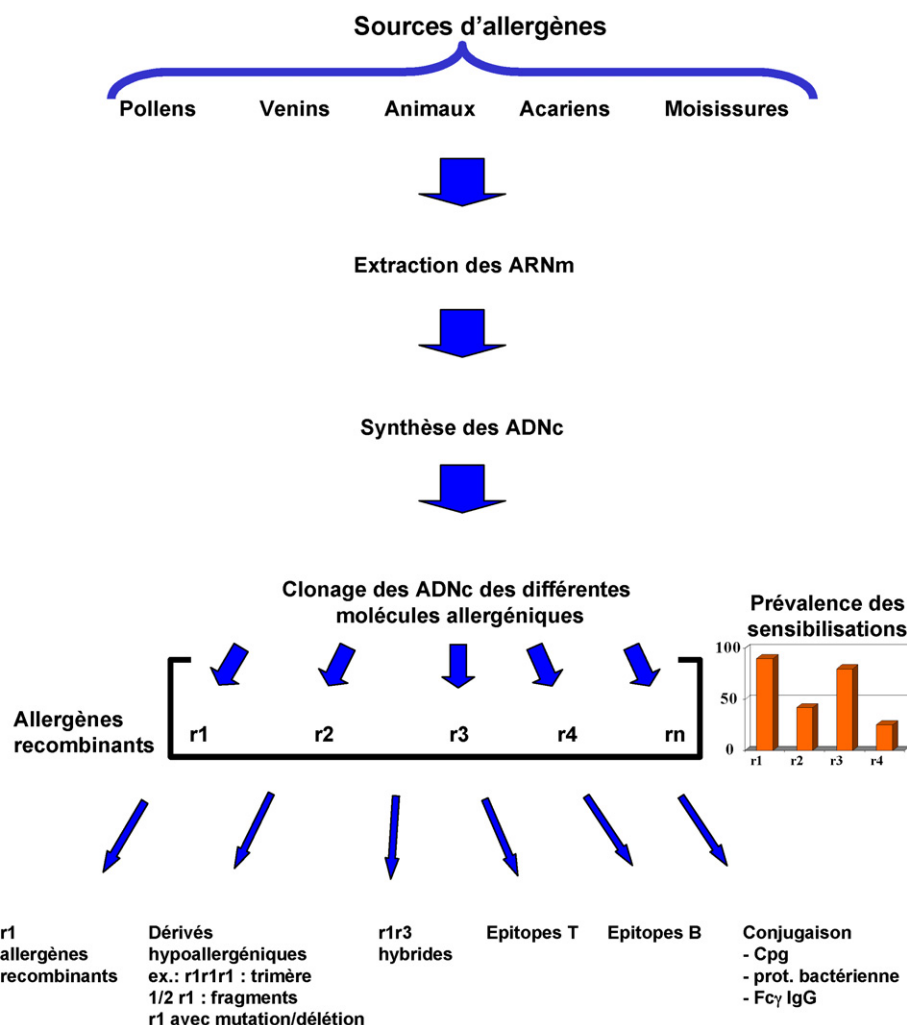


Fig. 1. Vue schématique des principaux axes de recherche pour la mise au point de nouvelles molécules destinées à l'immunothérapie.

sensibilisés à l'allergène naturel ont précédé l'utilisation d'allergènes recombinants et de leurs dérivés dans les explorations in vivo. L'activité biologique de nombreux allergènes recombinants a été confirmée chez les sujets sensibilisés par des investigations in vitro (histaminolibération des basophiles) et in vivo (tests cutanés essentiellement, mais aussi tests de provocation oculaire, nasale, voire bronchique) [30].

Le but de nombreuses recherches a été la sélection de molécules qui potentiellement seraient les meilleurs candidats pour l'immunothérapie, c'est-à-dire des molécules assurant une bonne efficacité clinique sans induire de réaction secondaire. La diminution de l'activité allergénique au niveau des cellules cibles de l'allergie, c'est-à-dire les basophiles et les mastocytes cutanés, paraissait être un des garants de cet objectif. Une des premières molécules testées sur un nombre élevé de patients a été un isoforme de Bet v 1, Bet v 1d ne différant que de sept acides aminés de Bet v 1a [31] pour lequel la diminution de l'allergénicité évaluée par des intradermoréactions par rapport à Bet v 1a atteignait un facteur 100, le test conjonctival restant négatif chez 48 patients avec Bet v1d, alors qu'il était positif

chez 38 sur 48 patients avec Bet v 1a [32]. Des réductions très importantes des tests cutanés chez des sujets sensibilisés à l'allergène naturel ont également été montrées pour des molécules hybrides tel que l'antigène 5S des venins [6], pour des polymères de Bet v 1 [22,23] et pour des fragments dérivés d'allergènes recombinants [22,23,33].

Ce n'est pourtant que l'injection répétée d'allergènes recombinants, ou de dérivés rendus hypoallergéniques, ou de molécules conjuguées à un co-stimulateur qui pourra établir l'intérêt thérapeutique de ces nouveaux produits. Certaines études pouvant être considérées comme préliminaires ne portaient que sur un nombre restreint de patients et étaient effectuées en ouvert [34]. Ainsi, l'injection de trois peptides correspondant aux épitopes T de la phospholipase A2 du venin montrait une protection totale après une provocation réaliste chez trois patients sur cinq, et une protection partielle chez les deux autres [35]. Il en est de même d'études en ouvert effectuées par injections répétées intradermiques de peptides T de l'allergène majeur de chat Fel d 1 qui étaient susceptibles d'entraîner la disparition des réactions cutanées et bronchiques que ces peptides induisaient initialement [36]. Ce n'est que très

récemment que les premiers essais cliniques effectués en double insu ont été rapportés.

3.2. Etudes en double insu

Les marqueurs de l'efficacité d'une immunothérapie n'étant toujours pas connus, seuls les résultats cliniques pourront attester du bénéfice de toute nouvelle thérapeutique dans ce domaine. En conséquence, seuls des essais cliniques contrôlés effectués selon les bonnes pratiques de la désensibilisation pourront confirmer les potentialités thérapeutiques des nouvelles molécules issues de la recherche.

Les résultats de l'efficacité doivent tenir compte des effectifs des patients inclus, de la pertinence clinique des différences statistiques observées pour la réduction des scores, des preuves d'activité évaluées sur des critères biocliniques (modifications des tests cutanés, des tests de provocation, des taux d'IgG1 et d'IgG4, de la production de cytokines). Le comparateur est un groupe placebo, mais peut également être un groupe traité par l'extrait naturel. Enfin, l'étude des effets secondaires dans chaque groupe est fondamentale, la survenue de réactions

anaphylactiques généralisées étant le signe d'un mauvais profil de tolérance du traitement institué. Nous rapportons ici les résultats de cinq études récentes ouvrant des perspectives sur l'emploi de nouvelles vaccinations chez l'allergique (Tableau 1).

Un dénominateur commun aux quatre études de désensibilisations réalisées avec des allergènes recombinants polliniques est l'augmentation significative des IgG spécifiques vis-à-vis de l'allergène naturel et vis-à-vis des allergènes recombinants utilisés par rapport à un groupe traité par placebo [37,38,39,40]. Cette augmentation est également rapportée avec le traitement utilisant l'allergène naturel dans l'une des études les plus récentes [40]. Elle est transitoire dans l'étude réalisée avec Amb a 1 conjugué au CpG, ce protocole ne comportant que six injections hebdomadaires [41]. Parmi les modifications biocliniques, la réduction des réactions immédiates cutanées est particulièrement significative dans les trois groupes traités dans l'étude comportant quatre bras, en comparaison du groupe placebo [40], ce critère ayant été considéré, dans des études réalisées avec des extraits classiques, comme un marqueur d'efficacité [42,43]. Les paramètres permettant de différencier les différences d'effica-

Tableau 1

Résumé succinct des cinq études les plus récentes (avec groupe témoin) ayant utilisé des produits issus de la biologie moléculaire pour l'immunothérapie

Allergènes	Nb de patients	Résultats cliniques	Modifications biocliniques		Effets secondaires systémiques	Publications
			Tests cutanés/tests de provocation	IgG1-IgG4		
rec Bet v 1 frag.	38	Score symptômes : pas de différence significative.	Pas de différence significative entre les groupes	Augmentation significative IgG1 anti-Bet v 1	1 CA et urticaires	V. Niederberger et al., PNAS 2004 [37]
rec Bet v 1 trimères	38	Score symptômes : $p = 0,044$		IgG4 anti-Bet v 1		A. Purohit (soumis)
Placebo	49					
Bet v 1 - FV (folding variant)	25	Score combiné médicaments et clinique : pas de différence significative		Augmentation ++ IgG1 et IgG4 anti nBet v 1	4 réactions généralisées dans chaque groupe.	Klimeck et al., A. CI Immunol, World Allergy Org 2005, suppl. [38]
Extrait de bouleau	26					
Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5a, Phl p 5b, Phl p 6	29	Diminution score symptômes $p = 0,15$ Diminution score combiné	Test de provocation conjonctivale : tendance à un seuil plus élevé chez patients traités ($p = 0,81$)	Augmentation ++ IgG1 et IgG4 anti-phléole anti rPhl p 1, rPhl p 5a/b		Jutel, JACI 2005 [39]
Placebo	28	$p = 0,051$				
rBet v 1	32	Diminution score symptômes moyen journalier : $p = 0,002$ $p = 0,0006$ $p = 0,0024$	Diminution significative dans groupes traités ($p < 0,0001$)	Augmentation ++ IgG1, IgG4, anti-bouleau, anti-rBet v 1, anti nBet v 1	1 CA dans groupe nBet v 1	Pauli et al., EAACI 2006 [40]
nBet v 1	29					
Extrait de bouleau	29					
Placebo	35					
Amb a 1 conj. CpG	14 (6 en final)	Score symptômes nasal au pic pollinique diminué ($p = 0,02$) Score analogique visuel diminué.	Diminution score symptômes après provocation nasale ($p = 0,03$) Diminution tests cutanés ($p = 0,04$)	Augmentation transitoire des IgG anti-ambrosie et anti-Amb a 1		Creticos, N Engl J Med 2006 [41]
Placebo	11 (9 en final)			Disparition du pic IgE anti-Amb a 1 post-saisonnier		

cité de deux traitements de désensibilisation reposent sur les scores symptômes et utilisent également, dans certains cas, le score combiné symptômes-médicaments. Hormis l'étude CpG [41] où l'analyse effectuée pendant la deuxième saison pollinique suivant le traitement ne regroupe au total (traitement actif et placebo) que 15 patients, le nombre de patients inclus dans les différentes études analysées ici, est sensiblement le même. La signification statistique des résultats est très élevée dans l'étude effectuée avec rBet v 1 [40] alors qu'on n'observe qu'une tendance avec celle utilisant fragments et trimères de Bet v 1 [37]. La recherche de la dose efficace n'a pas été préalablement établie et se basait uniquement sur la différence de réaction cutanée entre l'allergène naturel Bet v 1 et les dérivés hypoallergéniques. Cet indice ne paraît pas pertinent, puisque dans la même étude, on relevait une fréquence d'effets secondaires généralisés proche de la fréquence des effets secondaires rapportés dans les rushs et semi-rushs [44,45].

Au total, les résultats cliniques les plus significatifs ont été observés avec des allergènes recombinants non modifiés [39,40] en prenant en compte les scores symptômes pendant les saisons polliniques correctement identifiées dans chaque centre ayant participé aux études multicentriques. Dans ces études, on mettait également en évidence, de façon indiscutable, des modifications des critères biocliniques, en particulier des tests cutanés et des taux d'IgG. Des phases III sur des effectifs importants de patients paraissent maintenant souhaitables pour faire face aux exigences réglementaires du développement clinique des allergènes recombinants.

Références

- [1] Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999;29: 896–904.
- [2] Valenta R, Kraft D. From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2002;14:718–27.
- [3] Linhart B, Valenta R. Molecular design of allergy vaccines. *Curr Opin Immunol* 2005;17:646–55.
- [4] Cromwell O, Suck R, Kahlert H, Nandy A, Weber B, Fiebig H. Transition of recombinant allergens from bench to clinical application. *Methods* 2004;32:300–12.
- [5] Linhart B, Valenta R. Vaccine engineering improved by hybrid technology. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;134:324–31.
- [6] King TP, Jim SY, Monsalve RI, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Spangfort MD. Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen 5s1. *J Immunol* 2001;166:6057–65.
- [7] Linhart B, Hartl A, Jahn-Schmid B, Verdino P, Keller W, Krauth MT, et al. A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1010–6.
- [8] Metz-Favre C, Linhart B, Focke-Tejkl M, Purohit A, De Blay F, Valenta R et al. Skin test diagnosis of grass pollen allergy with a recombinant hybrid molecule. *J Allergy Clin Immunol* (en révision).
- [9] Briner TJ, Kuo M, Keating KM, Rodgers B, Greenstein J. Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by sub-cutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d 1. *P Natl Acad Sci USA* 1993;90:7608–16.
- [10] Hoyne GFR, O'Hehir DC, Wraith WR, Thomas WR, Lamb JR. 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* 1993;178:1783–8.
- [11] Liu YH, Kao MC, Lai YL, Tsai JJ. Efficacy of local nasal immunotherapy for Dp2-induced airway inflammation in mice: using Dp2 peptide and fungal immunomodulatory peptide. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:301–10.
- [12] Hall G, Houghton CG, Rahbek JU, Lamb JR, Jarman ER. Suppression of allergen reactive Th2 mediated responses and pulmonary eosinophilia by intranasal administration of an immunodominant peptide is linked to IL-10 production. *Vaccine* 2003;21:549–61.
- [13] Vrtala S, Hirtenlehner K, Vangelista L, Pastore A, Eichler HG, Sperr WR, et al. Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nonanaphylactic T cell epitope-containing fragments: candidates for a novel form of specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1997;99:1673–81.
- [14] Schramm G, Kahlert H, Suck R, Weber B, Stuwe HT, Muller WD, et al. Allergen engineering': variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity. *J Immunol* 1999;162:2406–14.
- [15] Swoboda I, De Weerd N, Bhalla PL, Niederberger V, Sperr WR, Valent P, et al. Mutants of the major ryegrass pollen allergen, Lol p 5, with reduced IgE binding capacity: candidates for grass pollen-specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2002;32:270–80.
- [16] Holm J, Gajhede M, Ferreras M, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, et al. Allergy vaccine engineering: epitope modulation of recombinant Bet v 1 reduces IgE binding but retains protein folding pattern for induction of protective blocking-antibody responses. *J Immunol* 2004;173: 5258–67.
- [17] Orlandi A, Grasso F, Corinti S, Marinaro M, Bonura A, Boirivant M, et al. The recombinant major allergen of *Parietaria judaica* and its hypoallergenic variant: in vivo evaluation in a murine model of allergic sensitisation. *Clin Exp Allergy* 2004;34:470–7.
- [18] Karisola P, Mikkola J, Kalkkinen N, Airenne KJ, Laitinen OH, Repo S, et al. Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes. *J Immunol* 2004;172:2621–8.
- [19] Buhot C, Chenal A, Sanson A, Pouvelle-Moratille S, Gelb MH, Menez A, et al. Alteration of the tertiary structure of the major bee venom allergen Api m 1 by multiple mutations is concomitant with low IgE reactivity. *Protein Sci* 2004;13:2970–8.
- [20] Saarne T, Kaiser L, Gronlund H, Rasool O, Gafvelin G, van Hage-Hamsten M. Rational design of hypoallergens applied to the major cat allergen Fel d 1. *Clin Exp Allergy* 2005;35:657–63.
- [21] Mine Y, Sasaki E, Zhang JW. Reduction of antigenicity and allergenicity of genetically modified egg white allergen, ovomucoid third domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:133–7.
- [22] van Hage-Hamsten M, Kronqvist M, Zetterstrom O, et al. Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1: results obtained with a mix of two recombinant Bet v 1 fragments and recombinant Bet v 1 trimer in a Swedish population before the birch pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:969–77.
- [23] Pauli G, Purohit A, Oster J, de Blay F, Vrtala S, Niederberger V, et al. Comparison of genetically engineered hypoallergenic rBet v 1 derivatives with rBet v 1 wild-type by skin prick and intradermal testing: results obtained in a French population. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1076–84.
- [24] Focke M, Mahler V, Ball T, Sperr WR, Majlesi Y, Valent P, et al. Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination. *FASEB J* 2001;15:2042–4.
- [25] Hochreiter R, Stepanoska T, Ferreira F, Valenta R, Vrtala S, Thalhamer J, et al. Prevention of allergen-specific IgE production and suppression of an established Th2-type response by immunization with DNA encoding hypoallergenic allergen derivatives of Bet v 1, the major birch-pollen allergen. *Eur J Immunol* 2003;33:1667–76.
- [26] Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Van Nest 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.

- [27] Marshall JD, Abtahi S, Eiden JJ, Tuck S, Milley R, Haycock F, et al. Immunostimulatory sequence DNA linked to the Amb a 1 allergen promotes T(H)1 cytokine expression while downregulating T(H)2 cytokine expression in PBMCs from human patients with ragweed allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:191–7.
- [28] Bohle B, Breitwieser A, Zwolfer B, Jahn-Schmid B, Sara M, Sleytr UB, et al. A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant fusion protein of a bacterial cell surface (S-layer) protein and the major birch pollen allergen Bet v 1 (rSbsC-Bet v 1) combines reduced allergenicity with immunomodulating capacity. *J Immunol* 2004;172:6642–8.
- [29] Zhu D, Kepley CL, Zhang K, Terada T, Yamada T, Saxon A. A chimeric human-cat fusion protein blocks cat-induced allergy. *Nat Med* 2005;11:446–9.
- [30] Pauli G, Deviller P. Allergènes recombinants. In: Vervloet D, Magnan A, editors. *Traité d'Allergologie*. Paris: Flammarion, Médecine Sciences; 2003. p. 34–40.
- [31] Ferreira F, Hirtenlehner K, Jilek A, Godnik-Cvar J, Breiteneder H, Grimm R, et al. Dissection of immunoglobuline 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.
- [32] Arquint O, Helbling A, Cramer R, Ferreira F, Breitenbach M, Pichler WJ. Reduced in vivo allergenicity of Bet v 1d isoform, a natural component of birch pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1239–43.
- [33] Zeiler T, Taivainen A, Rytkönen MP, Rautiainen J, Karjalainen H, Mantyjarvi R, et al. Recombinant allergen fragments as candidate preparations for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:721–7.
- [34] Pauli G. Désensibilisation: y a-t-il une place pour les allergènes recombinants ? *Rev Fr Allergol* 2002;42:335–42.
- [35] Muller U, Akdis CA, Fricker M, Blesken T, Bettens F, et al. Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:747–54.
- [36] Oldfield WLG, Kay AB, Larche M. Allergen-derived T cell peptide-induced late asthmatic reactions precede the induction of antigen-specific hyporesponsiveness in atopic allergic asthmatic subjects. *J Immunol* 2001;167:1734–9.
- [37] Niederberger V, Horak F, Vrtala S, Spitzauer S, Krauth MT, Valent P, et al. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *P Natl Acad Sci USA* 2004;101:14677–82.
- [38] Klimek L, Bachert C, Doerner C, Meyer H, Narkus A. Specific immunotherapy with recombinant birch pollen allergen rBet v 1-FV is clinically efficacious. *Allergy Clin Immunol Int* 2005;(Suppl No. 1):15.
- [39] Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:608–13.
- [40] Pauli G, Malling H, Rak S, Pastorello E, Purohit A, Larsen T et al. Clinical efficacy of subcutaneous immunotherapy in birch pollen allergic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with recombinant Bet v 1 versus natural Bet v 1 or standardized birch extract. Vienna, Austria: European Academy of Allergology and Clinical Immunology; 10–14 June 2006, 83 Abst.
- [41] Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006;355:1445–55.
- [42] Creticos PS, Reed CE, Norman PS, et al. Ragweed immunotherapy in adult asthma. *N Engl J Med* 1996;334:501–6.
- [43] Walker SM, Pajno GP, Lima MT, Wilson DR, Durham SR. Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:87–93.
- [44] Bousquet J, Hejjaoui A, Dhivert H, Clauzel AM, Michel FB. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. III. Systemic reactions during the rush protocol in patients suffering from asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:797–802.
- [45] Portnoy J, King K, Kanarek H, Horner S. Incidence of systemic reactions during rush immunotherapy. *Ann Allergy* 1992;68:493–8.