

Quanto e come la diagnostica molecolare (CRD) ha cambiato o cambierà le nostre scelte nell'immunoterapia specifica (Parte II)

a cura della Commissione Immunoterapia Specifica della SIAIP

Annamaria Bianchi, Sergio Arrigoni¹, Salvatore Barberi², Lucia Caminiti³,
Giovanna De Castro⁴, Andrea Di Rienzo Businco⁶, Guglielmo Scala⁵,
Salvatore Tripodi⁶ (coordinatore)



Parole chiave: allergeni molecolari, panallergeni, CRD, CRIT, ITS, SCIT, SLIT

Abstract

Nella prima parte pubblicata sul numero 6/2010 sono stati introdotti i nuovi concetti di allergologia molecolare che consentono di definire meglio il profilo allergenico del singolo paziente (*Component Resolved Diagnosis*, CRD).

In questa seconda parte viene sottolineata l'importanza della CRD nei soggetti polisensibili per la scelta dell'ottimale ITS per quel dato paziente, uno dei requisiti essenziali per la sua efficacia.

La nuova diagnostica di allergologia molecolare sta influenzando la produzione di estratti per ITS sempre più standardizzati e caratterizzati, in particolare da quando è stato introdotto l'obbligo di registrare tali prodotti come farmaci.

In letteratura sono già stati pubblicati i risultati positivi di alcuni trial clinici di immunoterapia specifica effettuata con allergeni molecolari, ricombinanti e/o naturali.

Nei prossimi anni saranno probabilmente disponibili tali vaccini in una formulazione adeguata a trattare un gran numero di pazienti con un profilo allergenico compatibile, mentre l'ITS "tagliata su misura" per il singolo soggetto, rimarrà un'utopia per i suoi costi improporzionabili.

Profilo allergenico del paziente

Essere allergico a una fonte allergenica non significa necessariamente essere sensibilizzati a tutte le proteine allergeniche presenti in essa. Ogni paziente ha un suo profilo di sensibilizzazione, cioè può avere IgEs

per molecole diverse dello stesso allergene e con diversa espressione quantitativa, che è in parte dipendente dall'esposizione ambientale e dalla genetica del singolo soggetto¹(Fig. 1).

Nella pratica quotidiana, inoltre, è significativo il ri-

U.O.C. di Pediatria, Ospedale Mazzoni, Ascoli Piceno; ¹ U.O.C di Pediatria, Ospedale "M. Melloni", Milano; ² U.O.C. di Pediatria, Ospedale "Sant'Andrea", Seconda Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "La Sapienza", Roma 2; ³ U.O. Allergologia Pediatrica, Policlinico Universitario, Messina; ⁴ Clinica Pediatrica, Università "La Sapienza", Roma; ⁵ U.O.S.D. Allergologia, "Loreto Crispi", Napoli; ⁶ Servizio Dipartimentale Allergologia Pediatrica, Ospedale "Sandro Pertini", Roma

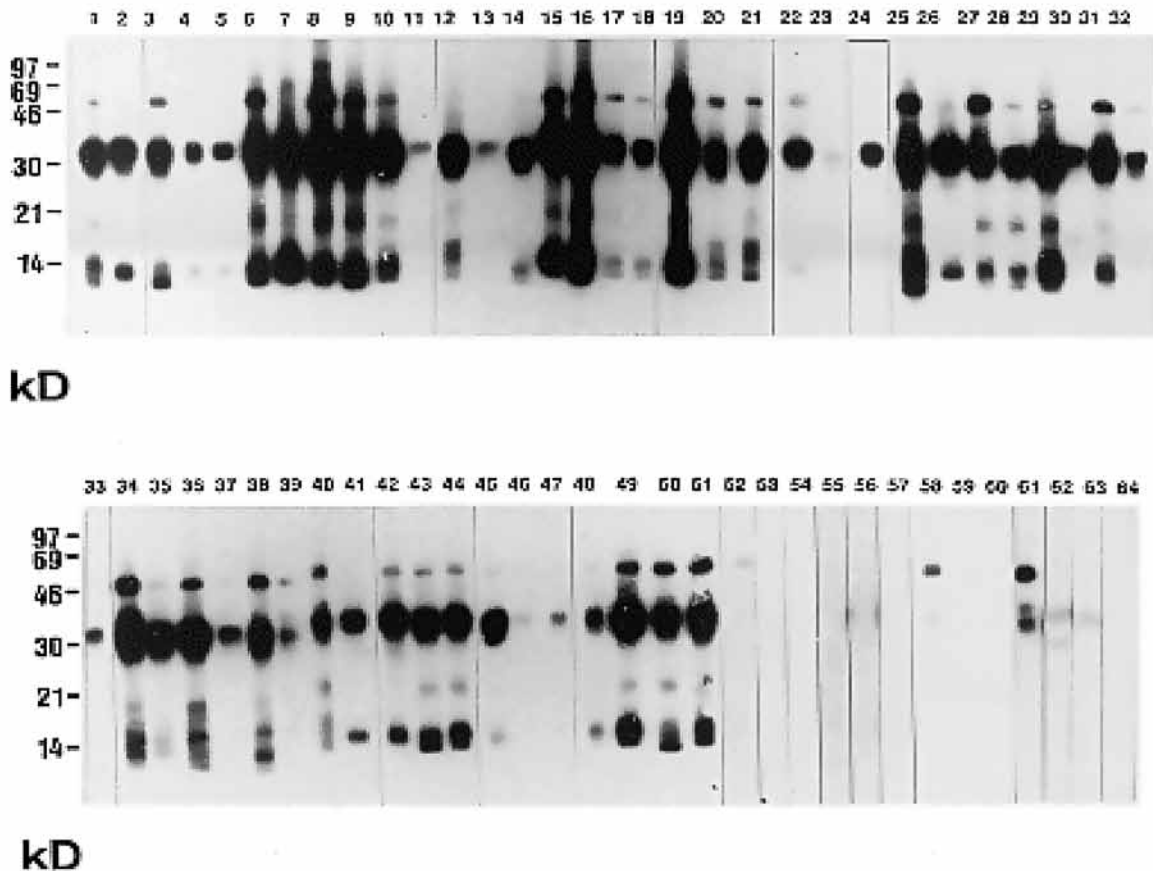


Fig. 1. Immunoblotting del siero di pazienti diversi, sensibili al *Phleum pratense* (linee 1-51 e 58, 61), che presentano pattern differenti di sensibilizzazione IgEs per le diverse molecole (da Heiss et al., 1999 1, mod.).

scontro di pazienti con rinocongiuntivite e/o asma allergica, che mostrino sensibilizzazioni multiple agli SPT e/o al dosaggio delle IgE specifiche per estratti. Spesso essi presentano sintomi severi e mal controllati con i farmaci e quindi sarebbero buoni candidati all'ITS, ma viene loro negata proprio perché è difficile individuare l'allergene/i principale/i.

In tali casi come ci si può orientare nella scelta della ITS ottimale? Il problema maggiore è capire se questa polisensibilizzazione è il risultato di una "co-sensibilizzazione", cioè una sensibilizzazione vera a molte e distinte molecole allergeniche di fonti diverse, o invece di un "co-riconoscimento o cross-reattività", legato alla sensibilizzazione ad allergeni diversi che condividono epitopi simili² o, infine, se coesistono entrambe le situazioni.

La CRD, identificando i markers di sensibilizzazione primaria e quelli di cross-reattività, consente di distinguere tra una vera ed una falsa polisensibilizzazione,

così da indirizzare meglio la scelta di una immunoterapia per gli allergeni markers primari. Alcuni recenti estratti per ITS sono già standardizzati in base a tale contenuto, espresso in ng o mcg, e tale procedura sarà obbligatoria con i nuovi prodotti che dovranno essere registrati come farmaci, come alcune SLIT verso graminacee già in commercio³⁻⁵.

Accanto alla diagnostica in vitro sono attualmente disponibili alcuni estratti per test in vivo a contenuto noto per molecole cross-reattive, quali quello per profilina purificata (Pho d 2 a concentrazione di 50 µg/mL) e polcalcina (concentrazione 500 µg/mL) entrambe ottenute dalla palma di dattero⁶. Un loro uso nella routine richiederà certamente altri studi per meglio definirne sensibilità e specificità, ma quasi certamente a breve un approccio diagnostico di tipo molecolare sarà possibile anche con gli SPT.

Dal punto di vista pratico proponiamo, nelle Figure 2 e 3, un semplice schema ed un algoritmo, che da esso

La CRD, poiché consente di distinguere tra una vera ed una falsa polisensibilizzazione, permette di indirizzare meglio la scelta di una immunoterapia per gli allergeni markers primari.

deriva, che possono aiutare a scegliere quali molecole markers di sensibilizzazione primaria e/o panallergeni sono da testare per definire il profilo allergenico del paziente polisensibile a pollini al fine della prescrizione della migliore ITS.

Qualità e caratterizzazione dei prodotti per la diagnostica e l'ITS

La diagnostica molecolare ha messo in luce anche un altro grosso problema, a lungo inaffrontato e tuttora parzialmente risolto, che è quello della qualità e caratterizzazione dei prodotti usati nella diagnostica e nell'immunoterapia.

Gli estratti allergenici utilizzati, infatti, sono una "imprevedibile miscela di componenti allergeniche e non" ⁷. Il termine imprevedibile non è usato a caso, poiché la loro composizione è influenzata da moltissimi fattori.

Il diverso contenuto di molecole allergeniche dipende infatti dal tipo di materiale grezzo usato dalle ditte per produrre l'estratto ⁸. Nel caso dei pollini, per esempio, tale contenuto può variare in funzione della varietà di pianta coltivata ⁹, condizioni climatiche ¹⁰, stadio di maturazione del polline ¹¹, fattori ambientali

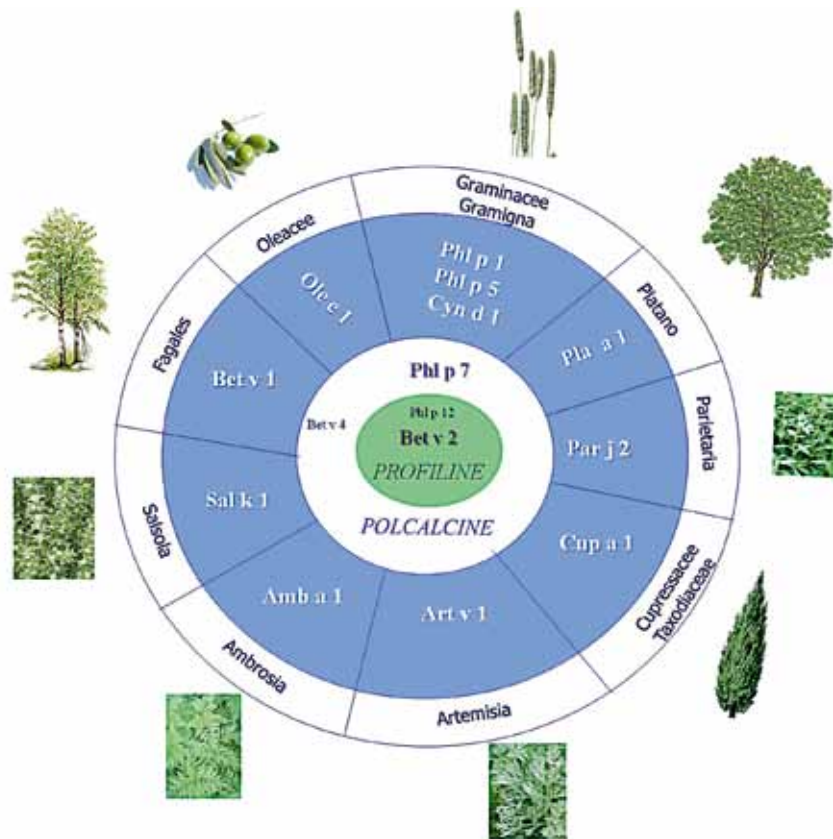


Fig. 2. Principali molecole markers di sensibilizzazione primaria e di cross reattività per i pollini; per le polcalcine e le profiline sono evidenziate in grassetto le molecole il cui dosaggio è consigliato (modificate da R. Asero).

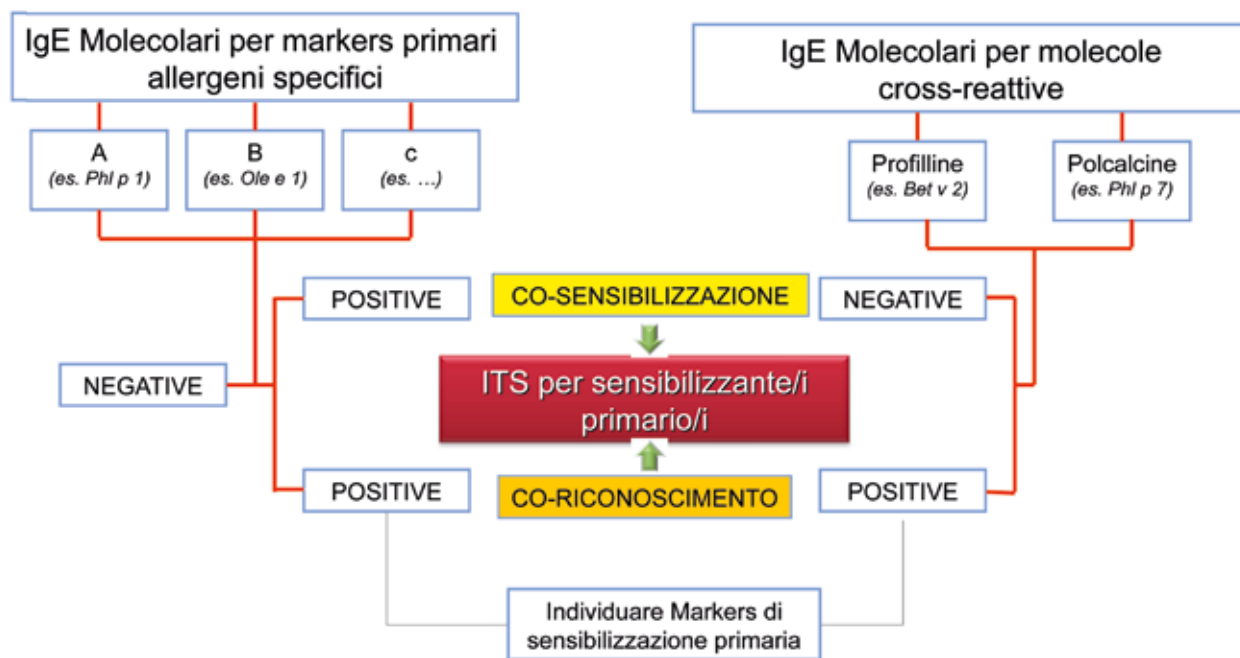


Fig. 3. Algoritmo per la diagnosi di co-sensibilizzazione e/o riconoscimento nei pazienti polisensibili a pollini (SPT e/o IgEs per estratti positivi), dosando le IgEs per markers di sensibilizzazione primaria e di cross reattività.

e di crescita^{12,13}, grado di idratazione del polline¹⁴, condizioni di conservazione. Ma sono soprattutto i metodi di estrazione e di trattamento che maggiormente influenzano la presenza degli allergeni e la loro possibile degradazione^{15,16}.

Esemplificativo in tal senso è lo studio di Focke¹⁷ in cui si dimostra come gli estratti per pollini di graminacee di differenti case produttrici presentano una considerevole eterogeneità nel contenuto delle singole molecole allergeniche e quindi una diversa risposta in vivo (SPT).

A questo va poi aggiunto il problema della standardizzazione. Fino a pochi anni fa questa era esclusivamente una standardizzazione "di tipo biologico", connessa alla capacità dell'estratto di legare le IgEs¹⁸. Tale caratteristica viene misurata sulla base della reattività cutanea, attraverso prick test e con test competitivi per le IgE quali RAST o ImmunoCAP inibizione¹⁹. Ogni ditta produttrice di vaccini allergenici esprime, perciò, la potenza del proprio prodotto con una propria unità di misura, riferita esclusivamente ad uno standard interno utilizzato (In-House Reference Standard - IHR) e questo rende i diversi prodotti non confrontabili tra loro. L'altro problema della stan-

dardizzazione biologica, emerso con l'avvento degli allergeni ricombinanti, è che questa non dà alcuna informazione relativa al contenuto di allergene maggiore specie-specifico nel vaccino.

Negli anni '90, quando la maggior parte degli allergeni maggiori e minori furono identificati e resi disponibili come allergeni ricombinanti, si fece strada il concetto che l'efficacia dell'ITS è legata ad una definita quantità di allergene maggiore. La WHO Position Paper del 1997, sulla base della revisione di 20 studi che confrontavano le dosi di allergene maggiore usate con successo nei preparati per immunoterapia, concludeva che "c'era una buona evidenza, da studi di immunoterapia con ambrosia, graminacee, acaro, gatto e veleno di imenotteri, che una dose di mantenimento per via iniettiva di 5-20 µg di allergene maggiore era associato ad un significativo miglioramento dello score sintomatologico del paziente²⁰. Successivi studi sull'efficacia dell'immunoterapia nell'allergia all'epitelio di cane e gatto hanno confermato questa dose di mantenimento²¹⁻²³. Si raccomandava quindi l'uso di preparati per ITS standardizzati, di contenuto allergenico noto, al fine di ottenere il maggior grado di efficacia.

Fu così che WHO/IUIS Committee, con lo scopo di rendere confrontabili i prodotti per immunoterapia e fornirne accurate informazioni relative al loro contenuto in componenti attive (allergene maggiore), diede il via nel 2001 ad un progetto europeo, denominato progetto CREATE ²⁴ finalizzato a raggiungere degli standard di riferimento (*reference standards*) e dei metodi analitici uguali per tutti. Quali *reference standards* furono identificate nove molecole ricombinanti (rBet v1, rPhl p 1, rPhl p 5a e rPhl p 5b, rOle e 1, rDer p 1, rDer p 2, rDer f 1 e rDer f 2) per gli otto allergeni maggiori e confrontate con gli allergeni naturali purificati, per caratteristiche fisico-chimiche (identità, purezza, ripiegamenti, stato di aggregazione, solubilità e stabilità) ed immunologiche (potenza di legame con le IgE, attività biologica e curva dose-risposta in ELISA). Di questi solo tre, rBet v1, rPhl p 5a, rDer p 2, mostravano una sufficiente somiglianza strutturale ed immunologica, nonché potenza biologica, analoga alla controparte naturale, tanto da poter essere considerati come materiale di riferimento internazionale. Due di questi ricombinanti allergenici, qualificati da CREATE come buoni candidati di riferimento, sono stati poi utilizzati in trial clinici di immunoterapia: rBet v1 ²⁵, rPhl p 5a ²⁶.

L'altro problema era standardizzare le metodiche dei dosaggi immunologici necessari alla quantificazione dell'allergene maggiore nell'estratto. La metodica scelta fu quella del sandwich *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). I risultati ottenibili con tale metodica sono legati alla diversa specificità che gli anticorpi monoclonali (mAb) usati possono avere per le differenti isoforme di una molecola allergenica ²⁷⁻²⁸. L'anticorpo monoclonale è estremamente specifico; esso, infatti, non riconosce tutta la proteina, ma solo una ristretta regione di questa, l'epitopo. Ne consegue che tale mAb può non riconoscere tutte le isoforme presenti in un estratto alla stessa maniera o, in casi estremi, può non riconoscere una specifica isoforma. È quanto osservato nello stesso progetto CREATE, quando per la misura del Phl p 5 e del gruppo 2 dell'acaro della polvere venivano usati rispettivamente il rPhl p 5b e il rDer p 2.01.01 come standard ¹⁹.

Uno sforzo in questo senso, ultimamente, si è fatto nei prodotti per SLIT registrati come farmaci (Grazax® e Oralair®), in cui le case produttrici dichiarano una quantità precisa e riproducibile almeno dell'allergene maggiore Phl p 5 ³⁻⁴.

C'è però da dire che alcuni autori sostengono che la vera potenza di un estratto non dipende solo dalla

Il diverso contenuto di molecole allergeniche usate negli estratti allergenici ha messo in luce un problema di standardizzazione delle metodiche dei dosaggi immunologici e di standardizzazione “biologica” dei prodotti utilizzati.

quantità di allergene maggiore, ma dalla sua globale attività biologica dovuta anche alla presenza degli allergeni minori. Non a caso si suggerisce che il confronto tra gli estratti per ITS di diverse aziende venga fatto esclusivamente sulla base di trial clinici ²⁹.

Component Resolved Immunotherapy (CRIT)

Da quanto su esposto, uno dei principali problemi dell'immunoterapia specifica è quello di utilizzare estratti naturali di scarsa qualità ³⁰, ottenuti direttamente da una sorgente allergenica grezza, in cui gli allergeni più importanti o non sono presenti in quantità sufficiente o mostrano una scarsa immunogenicità ¹⁷⁻³¹.

Per tale motivo negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso forme di immunoterapia che utilizzino allergeni molecolari (ricombinanti e/o naturali).

In questo senso trial clinici sono stati fatti utilizzando allergeni ricombinanti, sia come mix in modo da riprodurre l'estratto naturale ³² sia come ricombinanti allergenici modificati, che abbiano una ridotta attività allergenica ³³⁻³⁵, dimostrando che tale tipo di immunoterapia può essere efficace e sicura. In questo contesto è necessario dimostrare che tali formulazioni abbiano la stessa potenza degli allergeni naturali completi e che il pannello degli allergeni ricombinanti includa tutti gli epitopi riconosciuti dalle cellule B e T.

Nel caso delle graminacee in uno studio randomizzato in doppio cieco contro placebo (DBPC) è stato dimostrato che un pannello di cinque ricombinanti (Phl

p1, Phl p2, Phl p5a e Phl p5b, Phl p6) è in grado di ridurre in maniera significativa i sintomi e l'utilizzo dei farmaci in pazienti con rinocongiuntivite allergica da graminacee e di indurre una potente risposta IgG specifica³². Inoltre, dato degno di nota, 4 pazienti che non avevano IgEs per Phl p 5a/b, non le hanno prodotte a seguito della SCIT che anzi ha indotto una risposta di IgG1 e IgG4 specifiche verso tali molecole.

In un altro studio multicentrico randomizzato DBPC, 132 pazienti adulti sono stati sottoposti ad immunoterapia sottocutanea utilizzando 3 tipologie di vaccino (rBET v1, nBet v1 ed estratto di betulla). Miglioramento clinico e ridotto uso dei farmaci è stato rilevato in tutti e tre i gruppi, ma un più alto livello di IgG specifiche si è rilevato nel gruppo trattato con rBet v1³⁶.

Recentemente un nuovo specifico trattamento immunoterapico per alternaria con allergene nativo purificato (nAlt a1) è stato introdotto nel mercato, mostrando una buona immunogenicità e sicurezza³⁷.

Infine, un'applicazione particolare della diagnostica molecolare è il dosaggio delle IgG specifiche per allergeni molecolari che potrebbe essere usato per monitorare l'efficacia della ITS, come documentato per le IgG4s per Phl p 5 il cui incremento, dopo 2 anni di SCIT, correla con l'efficacia clinica, mentre tale dato non è stato osservato per il livello delle IgEs³⁸.

Conclusioni

Nell'immunoterapia allergene-specifica l'identificazione dell'allergene causa della malattia è fondamentale requisito per la riuscita del trattamento. E questo è particolarmente importante se si considera che più del 60%³⁹ dei pazienti allergici ai pollini sono polisensibilizzati. In questo quadro di polisensibilità, conoscere il profilo allergologico di un paziente e quindi poter distinguere tra sensibilizzazione verso markers di cross-reattività (profilline, polcalcine) e markers di sensibilizzazione primaria, costituisce il cardine per la scelta di un'ITS.

Le nuove possibilità di diagnostica molecolare ci consentono già oggi di ottenere tali risultati, anche se tuttora esistono problemi non risolti di classificazione, nomenclatura e significato clinico specie per le molecole cross-reattive, con dati a volte contrastanti tra i vari studi pubblicati.

Non va mai dimenticato però che i risultati dei test in vivo e/o vitro vanno, come sempre, correlati alla

storia clinica del paziente, poiché la sensibilizzazione verso un allergene non necessariamente implica una reazione clinica.

Le nuove conoscenze di CRD stanno, inoltre, provocando un processo di "selezione naturale" delle case produttrici di ITS, perché le costringe a preparare prodotti di qualità e standardizzazione sempre migliore e meglio caratterizzati sotto il profilo molecolare. Un buon indicatore per il prescrittore di ITS è anche quello di basarsi, nella scelta del produttore di un vaccino per immunoterapia, sul numero e qualità di studi da esso sponsorizzati (certo sarebbe meglio poter contare su studi indipendenti!) che documentino l'efficacia e sicurezza del prodotto per le varie fasce d'età.

I costi eccessivi per la produzione, commercializzazione e, soprattutto, registrazione di vaccini con specifiche molecole, sia ricombinanti sia naturali, probabilmente escludono la possibilità di CRIT fatta su misura per il singolo paziente.

Nel giro di pochi anni i risultati degli studi in corso (www.clinicaltrials.gov) che utilizzano miscele di molecole di una stessa sorgente capaci di coprire un ampio spettro di sensibilizzazione di un gran numero di pazienti con un profilo allergenico compatibile (es. Der p 1 e Der p 2 per gli allergici agli acari, o Bet v 1 per quelli allergici alla Betulla, Fel d 1 per il gatto, Phl p 1/2/5/6 per le graminacee) probabilmente consentiranno di avere dei prodotti standardizzati con contenuto definito degli allergeni costituenti. Ciò, finalmente, farà fare all'ITS il salto di qualità dalla fase empirica di prodotti a "miscela ignota" a "veri e propri farmaci".

Risoluzione del caso clinico

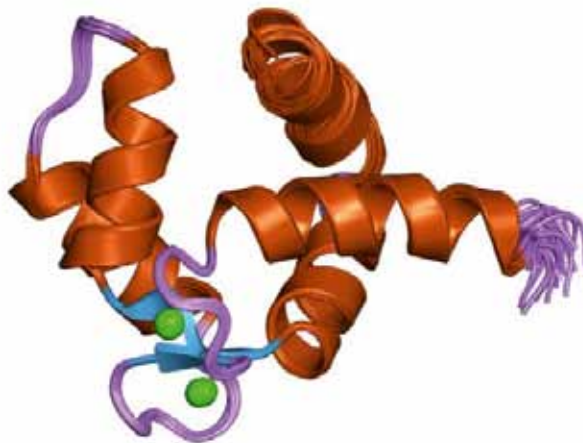
La CRD ha documentato la presenza di IgEs per Phl p 1, Phl p 5, Phl p 12 e negatività per Bet v 1, Ole 1 e Par j 2, pertanto a Marco è stata prescritta una SLIT per graminacee a contenuto noto e standardizzato di Phl p5.

Bibliografia

- 1 Heiss S, Mahler V, Steiner R, et al. *Component-resolved diagnosis (CRD) of type I allergy with recombinant grass and tree pollen allergens by skin testing*. J Invest Dermatol 1999;113:830-37.

- 2 Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, et al. *Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic*. *Allergy* 2004;59:243-67.
- 3 Wahn U, Tabar A, Kuna P, et al.; SLIT Study Group. *Efficacy and safety of 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in pediatric allergic rhinoconjunctivitis*. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:160-6.
- 4 Bufe A, Ziegler-Kirbach E, Stoeckmann E, et al. *Efficacy of sublingual swallow immunotherapy in children with severe grass pollen allergic symptoms: a double-blind placebo-controlled study*. *Allergy* 2004;59:498-504.
- 5 *Guideline on the Clinical Development of Products for Specific Immunotherapy for the Treatment of Allergic Diseases*. EMEA, CHMP/EWP/18504/2006, adopted by CHMP November 20, 2008.
- 6 Asero R, Jimeno L, Barber D. *Preliminary results of a skin prick test-based study of the prevalence and clinical impact of hypersensitivity to pollen panallergens (polcalcin and profilin)*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:35-8.
- 7 Mari A. *When does a protein become an allergen? Searching for a dynamic definition based on most advanced technology tools*. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1089-94.
- 8 Esch RE. *Allergen source materials and quality control of allergenic extracts*. *Methods* 1997;13:2-13.
- 9 Castro AJ, de Dios Alche J, Cuevas J, et al. *Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1*. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:164-73.
- 10 Hjelmroos M, Schumacher MJ, Van Hage-Hamsten M. *Heterogeneity of pollen proteins within individual Betula pendula trees*. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;108:368-76.
- 11 Mittermann I, Swoboda I, Pierson E, et al. *Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (Nicotina tabacum): increased profilin expression during pollen maturation*. *Plant Mol Biol* 1995;27:137-46.
- 12 Midoro-Horiuti T, Brooks EG, Goldblum RM. *Pathogenesis related proteins of plants as allergens*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87:261-71.
- 13 Hayek B, Reichenauer T, Kraft D. *Valenta Elevated levels of ozone increase allergen contents in pollen of rye (Secale cereal L.)*. *Allergy* 1999;54:OP10-85.
- 14 Vrtala S, Grote M, Duchene M, et al. *Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity*. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;102:160-9.
- 15 Malling HJ. *Skin prick testing in biological standardization of allergenic products*. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* 1997;91:157-63.
- 16 Nelson HS, Ikle D, Buchmeier A. *Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing*. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:382-8.
- 17 Focke M, Marth K, Flicker S, et al. *Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts*. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1400-8.
- 18 van Ree R. *Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization*. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:270-7.
- 19 van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, et al. *The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification*. *Allergy* 2008;63:310-26.
- 20 Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. *Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper*. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:558-62.
- 21 Nanda A, O'connor M, Anand M, et al. *Dose dependence and time course of the immunologic response to administration of standardized cat allergen extract*. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1339-44.
- 22 Lent AM, Harbeck R, Strand M, et al. *Immunological response to administration of standardized dog allergen extract at differing doses*. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1249-56.
- 23 Nelson HS. *Allergen immunotherapy: where is it now?* *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:769-79.
- 24 van Ree R. *The CREATE project: EU support for the improvement of allergen standardization in Europe*. *Allergy* 2004;59:571-4.
- 25 Batard T, Didierlaurent A, Chabre H, et al. *Characterization of wild-type recombinant Bet v 1a as a candidate vaccine against birch pollen allergy*. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136:239-49.
- 26 Jutel M, Jaeger L, Suck R, et al. *Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens*. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:608-13.
- 27 Hakkaart GA, Chapman MD, Aalberse RC, et al. *Immune-reactivity of recombinant isoforms of the major house dust mite allergen Der p 2*. *Clin Exp Allergy* 1998;28:169-74.
- 28 Smith AM, Benjamin DC, Derewenda U, et al. *Sequence polymorphisms and antibody binding to the group 2 dust mite allergens*. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:61-3.
- 29 Desiree Larenas-Linnemann MD, Linda S. Cox MD *European allergen extract units and potency: review of available information*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100:137-45.

- ³⁰ Focke M, Swoboda I, Marth K, et al. *Developments in allergen-specific immunotherapy: from allergen extracts to allergy vaccines bypassing allergen-specific immunoglobulin E and T cell reactivity.* Clin Exp Allergy 2010;40:385-97.
- ³¹ Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, et al. *Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies.* Clin Exp Allergy 2003;33:1198-208.
- ³² Jutel M, Jaeger L, Suck R, et al. *Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens.* J Allergy Clin Immunol 2005;116:608-13.
- ³³ Niederberger V, Horak F, Vrtala S, et al. *Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease.* Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:14677-82.
- ³⁴ Pace E. *Hypoallergenic fragment of Par j 2 increases functional expression of toll-like receptors in atopic children.* Allergy 2006;61:1459.
- ³⁵ Gonzalez-Rioja R, Ibarrola I, Arilla MC, et al. *Genetically engineered hybrid proteins from Parietaria judaica pollen for allergen-specific immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol 2007;120:602-9.
- ³⁶ Pauli G, Larsen TH, Rak S, et al. *Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis.* J Allergy Clin Immunol 2008;122:951-60.
- ³⁷ Prieto L, Aldana D, Palacios R, et al. *Inmunoterapia con nAlt a 1 mediante pauta cluster: seguridad e inmunogenicidad.* Journal Investig Allergol Clin Immunology 2009;19(Suppl 3):168.
- ³⁸ Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, et al. *Grass pollen immunotherapy induces mucosal and periferal IL-10 responses and blocking IgG activity.* J Immunol 2004;172:3252-9.
- ³⁹ Mari A. *Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis.* Int Arch Allergy Immunol 2001;125:57-65.



"Illustrazione della struttura molecolare della polcalcina Bet v 4. Da <http://www.ebi.ac.uk>