

## Von der Allergenerkennung durch Antikörper zu neuen therapeutischen Konzepten

Brigitte Hantusch und Erika Jensen-Jarolim

Center für Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien, Wien, Österreich

Eingegangen am 20. August 2007, angenommen nach Revision am 26. September 2007  
© Springer-Verlag 2007

### From the allergen-recognition by antibodies to new therapeutic concepts

**Summary.** Cross-linking of IgE antibodies through allergens is a basic event in type I allergy and leads to the immediate release of mediators like histamine, responsible for allergic symptoms like rhino-conjunctivitis or asthma. Critical for the binding of allergens to IgE are the IgE-epitopes, which represent a congregation of several amino acid residues often derived from different regions of the allergen. By means of the mimotope-technology, we isolated peptides from phage libraries, which were able to structurally mimic IgE-epitopes of the plant allergens Bet v 1 (birch) and Phl p 5a (timothy grass). Hence, these are candidates for an epitope-specific immunotherapy. In this mode of immunotherapy, it is the aim to induce IgG antibodies directed exclusively against the IgE-epitopes of allergens without induction of anaphylactogenic IgG species, and without the risk of anaphylaxis through cross-linking of IgE. Immunizing mice, we applied the mimotopes displayed on bacteriophages as well as on alternative carrier systems to enhance their antigenicity. With these systems it was possible to elicit an allergen-specific immune response, which was also accompanied by the appropriate T-cell help. Mimotopes resemble a promising concept for an epitope-tailored immunotherapy of allergic patients.

**Key words:** IgE-antibody, IgE-epitope, mimotope, blocking antibodies.

**Zusammenfassung.** Die Kreuzvernetzung von IgE-Antikörpern durch Allergene ist das Schlüsselereignis der Typ I Allergie und führt zum sofortigen Ausstoß von Entzündungsmediatoren wie Histamin, welche für allergische

Symptome wie Rhino-Konjunktivitis oder Asthma verantwortlich sind. Entscheidend für die Bindung der Allergene an IgE sind die IgE-Epitope, welche ein Zusammenspiel mehrerer Aminosäuren aus verschiedenen Regionen des Allergens darstellen. Wir haben mittels Mimotope-Technologie Peptide aus Bakteriophagenbanken isoliert, die die IgE-Epitope der Pflanzenallergene Bet v 1 (Birke) und Phl p 5 (Wiesenlieschgras) strukturell nachahmen können. Sie sind Kandidaten für eine Epitop-spezifische Immuntherapie. Bei dieser Art der Immuntherapie sollen ganz gezielt IgG-Antikörper gegen die IgE-Epitope von Allergenen induziert werden, und zwar ohne die Induktion anaphylaktogener IgG Spezies, und ohne das Risiko einer Anaphylaxie durch IgE-Kreuzvernetzung. In Immunisierungen an Mäusen verwendeten wir neben den Mimotopen an Bakteriophagen verschiedene Carriersysteme, um die Antigenizität der Mimotope zu fördern. Mit diesen war es möglich, eine allergenspezifische Immunantwort auszulösen, die auch von der notwendigen T-Zell Hilfe begleitet war. Mimotope stellen ein vielversprechendes Konzept für eine maßgeschneiderte Immuntherapie in Allergikern dar.

**Schlüsselwörter:** IgE-Antikörper, IgE-Epitop, Mimotope, blockierende Antikörper.

**Abkürzungen:** IgE: immunoglobulin E; IgG: immunoglobulin G; Bet v 1: birch pollen allergen 1; Phl p 5: timothy grass pollen allergen 5.

### Einleitung

Bei Allergien bilden die Patienten IgE-Antikörper, die in verschwindend kleinen Mengen im Serum vorkommen, weil sie sich an IgE-Rezeptoren Histamin-beladener Zellen (Mastzellen, basophile Granulozyten) setzen und sich dann eher in Haut und Schleimhäuten aufhalten. Treffen Allergene auf diese IgE-besetzten Effektorzellen, können sie zwei benachbarte IgE-Moleküle quervernetzen. Nur wenn dies geschieht, werden diese Zellen aktiviert und entlassen explosionsartig u. a. Histamin in die Umgebung. Dieser Entzündungs-Mediator ist letztlich für die

Korrespondenz: Prof. Dr. Erika Jensen-Jarolim, IPP – Institut für Pathophysiologie, Center für Physiologie, Pathophysiologie und Immunologie, Medizinische Universität Wien, Währinger Gürtel 18–20, 1090 Wien, Österreich.  
Fax: ++43-1-404005130  
E-Mail: erika.jensen-jarolim@meduniwien.ac.at

Entstehung der allergischen Sofortsymptome verantwortlich, wie z. B. Bindehautentzündung, Heuschnupfen oder Asthma. Weil die Kreuzvernetzung von IgE durch Allergene das Schlüsselereignis der Allergie vom Typ I darstellt, haben wir uns in den vergangenen Jahren mit denjenigen molekularen Strukturen aus Birken- und Gräserallergenen beschäftigt, welche für die IgE-Bindung ausschlaggebend sind, den sogenannten IgE-Epitopen. Diese stellen dreidimensionale Strukturen auf der Allergenoberfläche dar, die wir mittels Mimotop-Technologie aufklären konnten. Die Mimotop-Technik erlaubt es, aus Bakteriophagen-Bibliotheken, die eine Vielzahl von verschiedenen Peptidstrukturen tragen, kleine Peptide zu fischen, welche die natürlichen Epitope strukturell nachahmen (engl. to mimic), weshalb sie Mimotope genannt werden. Mimotope dienen nicht nur zur Lokalisation von natürlichen IgE-Epitopen, sie könnten in der Zukunft auch direkt für Impfungen eingesetzt werden. Damit erzielt man Antikörper mit derselben Spezifität wie IgE, jedoch aus der IgG-Klasse, welche vorwiegend frei löslich im Serum vorkommen. Daher können patrouillierende IgG-Antikörper Allergene erkennen und auch abfangen, dabei aber nicht Histamin-beladene Zellen triggern. Dies ist ein wichtiges Prinzip der Allergen-Immuntherapie (Desensibilisierung), die seit fast 100 Jahren beinahe unverändert mit natürlichen Extrakten aus Allergenquellen (Pollen, Milben, Sporen, etc.) durchgeführt wird [1]. Schon Cooke et al. hatten 1935 erkannt, dass induzierte IgG-Antikörper blockierendes Potential haben [2]. Bei dieser konventionellen Art der Allergen-Immunisierung besteht jedoch die Gefahr, dass die applizierten Allergene das bereits vorhandene IgE im Patienten kreuzvernetzen und es daher zu starken Nebenwirkungen, bis hin zum allergischen Schock, kommen kann [3]. Das Ziel unserer Studie ist daher, eine Mimotop-Impfung zu generieren, die folgende Bedingungen erfüllt: der Impfstoff soll 1) die natürlichen Epitope perfekt nachahmen, aber 2) IgE nicht kreuzvernetzen können.

### Allergenmolekül: Struktur als Voraussetzung für IgE-Bindung

Allergene, darunter besonders die Pollenallergene, gehören zu den am besten erforschten Molekülen, dennoch ist nur wenig über die genaue Lokalisation der Bindungsstellen von IgE-Antikörper an sie, ihre sogenannten B-Zell Epitope, bekannt. Das liegt teilweise daran, dass in den vergangenen fünfzehn Jahren der Schwerpunkt der Allergieforschung auf der Analyse von T-Zell Epitopen lag, den Erkennungsstellen für die T-Zellen des Immunsystems [4, 5]. Wir messen hingegen der humoralen Immunantwort eine ebenso bedeutende Rolle in der allergischen Reaktion zu und glauben, dass die Allergen-B-Zell Epitope wesentlich für die Induktion und selektive Steuerung einer Immunantwort sind. Beispiele dafür sind monoklonale Antikörper, die die IgE-Bindung verstärken oder inhibieren können [6–8]. Die antikörperbindenden Regionen – antigene Determinanten – eines Allergens werden von seiner Proteinstruktur bestimmt. Antikörper können kontinuierliche Proteinbereiche aus dem Aminosäuregerüst von Allergenen erkennen (Abb. 1A), doch weitaus häufiger findet man strukturell komplexe Epitope [9], die von Aminosäureresten aus verschiedenen Bereichen des

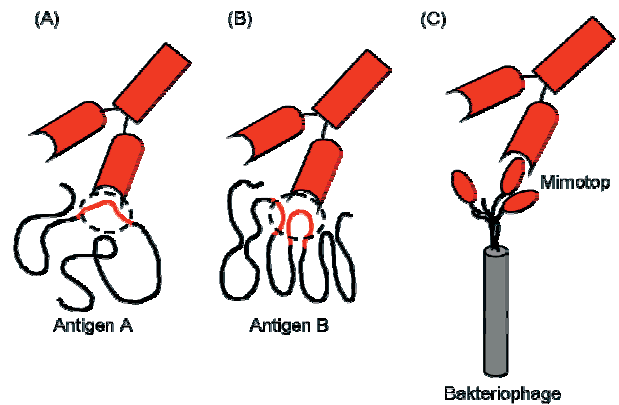


**Abb. 1.** B-Zell Epitoperkennung durch Antikörper: (A) Erkennung eines kontinuierlichen Epitops; (B) Erkennung eines konformationellen Epitops; (C) Mimotop, das am Phagenprotein pIII präsentiert werden, ahmen ein Epitop nach und werden erkannt

Allergens gebildet werden, sogenannte Konformations-epitope (Abb. 1B). Man nimmt heute an, dass etwa 15–20 Aminosäuren, die aus 2–5 Segmenten des Antigens stammen, ein typisches B-Zell Epitop formen [10–12].

### Mimotop-Technologie

Auskunft über B-Zell Epitope kann die Phage display Technologie geben. Dabei werden mittels allergenspezifischer Antikörper Peptide aus einer umfangreichen Bakteriophagen-Bibliothek von zufallsgenerierten Peptiden durch wiederholte Anreicherung herausselektioniert (Abb. 2). Diese Methode der spezifischen Anreicherung bezeichnet man als „Biopanning“. Es können hierbei sowohl monoklonale [13, 14] als auch polyklonale Antikörper [15] eingesetzt werden, und es sind entsprechend strenge Kontrollen mitzuführen, um die Peptide, die selektioniert werden, auch als Mimotope klassifizieren zu können [16]. Peptide, die spezifisch an den Selektionsantikörper binden, enthalten entweder strukturelle Elemente des ursprünglichen Epitops am Allergen, oder imitieren diese auf Grund molekularer Mimikry (Abb. 1C). Deshalb wurde durch Geysen der Begriff Mimotope geprägt

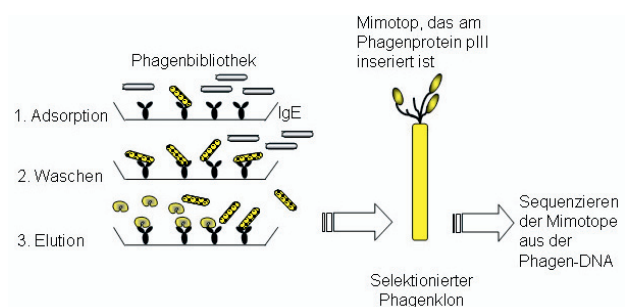


**Abb. 2.** Das Prinzip des Biopannings: Mimotope werden mit Hilfe eines selektionierenden Antikörpers, z. B. Allergen-spezifischem IgE, aus der Vielfalt zufallsgenerierter Peptide einer Bakteriophagenbibliothek isoliert. Die Schritte 1.–3. werden drei bis vier Mal hintereinander wiederholt, um die Mimotope stark anzureichern. Die Elution der Mimotope kann durch sauren pH oder durch Konkurrenz mit dem Allergen erfolgen.

[17]. Diese Methode umgeht sehr elegant die Schwierigkeiten der Epitopkartierung mithilfe anderer Ansätze, wie z. B. durch Deletionsmutanten oder überlappende Peptidfragmente mittels einer Spots Membran, die auf dem stückweisen Zerlegen des Antigens und nachfolgender serologischer Testung (mapping) beruhen. Der Nachteil liegt hier darin, dass identifizierte Peptide lediglich über lineare antigene Determinanten Aufschluss geben können. Mehrere solcher linearer Abschnitte können allerdings im dreidimensionalen Raum ein geschlossenes, oberflächliches Epitop bilden. Die mittels Phage display selektierten Peptide können auf mehrere Arten für die Epitop-Identifizierung herangezogen werden. Ähnlich wie mittels überlappenden Fragmenten kann man direkte Homologievergleiche der Peptide mit der Allergensequenz anstellen und dadurch Aminosäure-Sequenzen, die am Epitop beteiligt sind, identifizieren [18–20]. Darüber hinaus ist es aber auch möglich, die Mimotope für eine dreidimensionale Epitopsuche unter Verwendung von Computeralgorithmen, die die Ähnlichkeit des Mimotops mit der Antigenoberfläche berechnen, heranzuziehen [21–24]. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der Proteinstruktur des Allergens. Mit diesen Methoden wurden bereits Konformationsepitope verschiedenster Antigene aufgeklärt [13, 25–28].

Phagenbibliotheken können unterschiedliche Typen von Mimotopen präsentieren, das Spektrum reicht von kleinen linearen oder zirkulären Peptiden in der Länge von acht bis zwanzig Aminosäuren bis zu “giant mimotopes”, das sind Fab- oder Fv-Fragmente von Antikörpern aus sogenannten kombinatorischen Bibliotheken. Wir verfügten in unserer Arbeit sowohl über Peptidbibliotheken [29] als auch über eine Fab-Bibliothek, die aus dem B-Zell Repertoire eines Graspollen-Allergikers kloniert worden ist [30].

### Mimotope der Pollenallergene Bet v 1 und Phl p 5

Das Hauptallergen aus der Birke, Bet v 1, wird von etwa 95 % der birkenpollenallergischen Patienten erkannt, wovon 60 % ausschließlich gegen dieses Allergen reagieren [31]. Die Graspollenallergie betrifft wahrscheinlich mindestens 25 % der Gesamtbevölkerung [32], und schätzungsweise 40 % aller Typ I allergischen Patienten sind gegen Graspollenproteine sensibilisiert [33]. Phl p 5 repräsentiert eines der Hauptallergene im Wiesenlieschgras (*Phleum pratense*) und ist für die Bindung von bis zu 60 % des Graspollen-spezifischen IgEs in den Sera von allergischen Patienten verantwortlich [34]. Diese beiden Pollenproteine stellen daher wesentliche allergene Komponenten dar, und sie sind wichtige Ziele für die Immuntherapie. Mit Hilfe der Mimotop-Technologie konnten wir kürzlich die IgE-Epitope von Bet v 1 und einer wichtigen Isoform von Phl p 5, dem Phl p 5a [35], identifizieren [22, 36]. Wir verwendeten affinitätsgereinigtes Patienten-IgE, um damit Liganden aus einer zirkulären dekameren Peptidbibliothek [29] zu selektionieren. Bei der Untersuchung von Bet v 1, das nur etwa halb so groß wie Phl p 5 ist, wurde mit Hilfe von Mimotopen ein Hauptepitop für IgE identifiziert [22]. Ein Peptid-Alignment der Mimotope mit den lösungszugänglichen Aminosäuren von Phl p 5a ergab Homologien mit drei Regionen des Moleküls. Auf der Moleküloberfläche formten

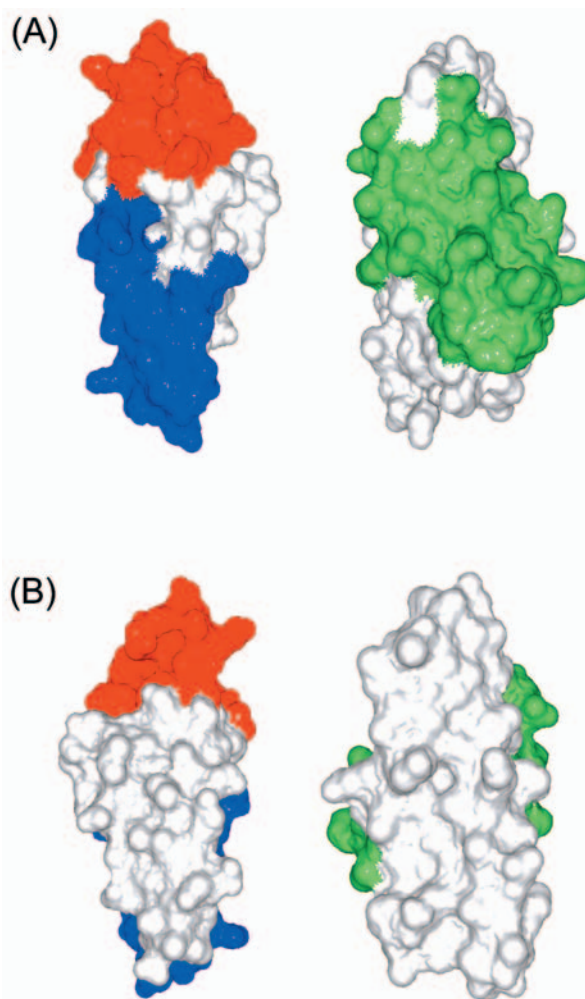


**Abb. 3.** Mimotope führen zur Identifikation der Konformationsepitope von IgE auf dem Gräserallergen Phl p 5a. (A) Phl p 5a besteht aus zwei Domänen, die getrennt gezeigt werden müssen, da die Strukturbestimmung des gesamten Moleküls bisher unmöglich war. Die drei durch Homologievergleich mit den Mimotopen identifizierte Konformationsepitope sind rot, blau und grün eingezeichnet. (B) Die 180°-Rotation der beiden Molekülhälften macht sichtbar, dass auf den Rückseiten keine Epitope vorhanden sind.

genau diese Regionen geschlossene Flächen und bildeten somit drei Konformationsepitope (Abb. 3A). Interessanterweise fanden wir auf den Rückseiten der beiden Moleküldomänen keine Homologien. Möglicherweise interagieren hier die beiden Molekülhälften (Abb. 3B) bei der Bildung der Tertiärstruktur von Phl p 5a. Wir konnten weiters die funktionelle Mimikry der Mimotope beweisen, indem wir zeigten, dass die Mimotope in der Lage sind, die Bindung von IgE an Phl p 5a entschieden zu inhibieren. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Interaktion zwischen Allergenen und IgE zu den stärksten bekannten biologischen Bindungen zählen [37]. In einer weiteren Arbeit haben wir mit Phl p 5-spezifischem IgE „giant mimotopes“ aus einer Fab-Bibliothek gefischt,

die durch ihrer Größe eine noch effizientere Blockierung der IgE-Allergen Bindung gewährleisteten [38, 39]. Diese Mimotope, wie auch die Fab-Mimotope, sind offensichtlich Kandidaten für eine Epitop-spezifische Impfung in der Allergietherapie.

### **Klassische Immuntherapie – Konzept der blockierenden Antikörper**

Seit ihrer Einführung von L. Noon und J. Freeman im Jahr 1911 [1] hat sich die Allergenimmuntherapie nicht grundlegend geändert. Es werden dabei dem Patienten ansteigende Dosen eines Allergenextrakts i.m. verabreicht, bis ein merklicher Schutz erreicht wird, der sich durch verringerte Allergiesymptomatik äußert („Desensibilisierung“). Die wiederholte Applikation des Allergens führt erwiesenermaßen zur Induktion von IgG-Antikörpern, die das Zeichen für eine gelungene spezifische Immuntherapie darstellen [2, 40, 41]. Paradoxiertweise sind die Allergenextrakte zusätzlich mit Aluminiumhydroxid versetzt, einem Adjuvans, von dem man weiß, dass es die Th2-Antwort bei Immunisierungen fördert – und damit auch die Induktion von IgE [42–44]. Der positive Effekt der Immuntherapie wurde in den letzten Jahren als modifizierte Th2-Antwort [45] oder Th1-Antwort [46] ausgelegt, die in den Patienten anfänglich zu einem Boost von IgE und später zu einer starken Produktion von IgG4 führt, welche möglicherweise als blockierende Antikörper für den entstehenden Schutz verantwortlich sind [47–49]. Es ist schon seit geraumer Zeit bekannt, dass Patienten bei dieser Art der Immuntherapie gegen Komponenten im verabreichten Allergenextrakt, gegen die sie ursprünglich nicht allergisch waren, zusätzlich neu sensibilisiert werden können [42, 43]. Nur ein Bruchteil der Proteine in einem natürlichen Proteinextrakt sind nämlich Allergene, und nur diese sind relevant für die Behandlung eines Patienten. Ein eher günstiges Beispiel dafür ist der bereits oben erwähnte Birkenpollen, in dem das Hauptallergen Bet v 1 mehr als 95 % des IgE aus Patientenseren bindet. Für Graspollenallergiker hingegen, die hauptsächlich gegen Phl p 5 sensibilisiert sind, bedeutet es, dass etwa die Hälfte der im Pollenextrakt befindlichen Extraktkomponenten für ihre Therapie irrelevant sind. Daraus ergab sich das Konzept der „Component-resolved diagnosis and therapy“, das auf der Anwendung rekombinanter Allergene basiert [50]. Damit soll erreicht werden, dass Patienten nur mit jenen Molekülen behandelt werden, gegen die sie auch IgE Antikörper besitzen. Zusätzliche Sensibilisierungen werden dadurch ausgeschlossen.

Im Zuge einer Immuntherapie mit natürlichen wie rekombinanten Allergenen können neben blockierenden jedoch auch anaphylaktogene IgG-Antikörper entstehen [51]. Wir gehen daher noch einen Schritt weiter und generieren Epitop-spezifische Vakzine. Unsere Ziele bei der Entwicklung neuer Immuntherapien waren die folgenden: 1) die Erzeugung von rekombinanten Konstrukten, die die Mimotope tragen, um sie in einer Epitop-spezifischen Immuntherapie anzuwenden; 2) das Austesten verschiedener synthetischer Carriersysteme für die Mimotope; und 3) die Charakterisierung der Anti-Mimotop Immunantwort.

### **Neues Konzept der Immuntherapie – Mimotopimmunisierung**

Wir verwendeten Mimotope in Immunisierungen, um blockierende IgG-Antikörper zu induzieren. In ersten Experimenten wurden Mäuse mit den Mimotopen an den Bakteriophagen immunisiert und ihre Immunantwort analysiert. Sowohl mit Bet v 1, als auch mit Phl p 5a-Mimotopen wurde dabei in den Mäusen eine allergenspezifische Antwort induziert [22, 36]. Die Mäuse produzierten Antikörper, die gegen das ursprüngliche Allergen gerichtet waren. Unsere Studien zeigten, dass die Phagen bei den Immunisierungen als Träger der Mimotope anscheinend eine wichtige Adjuvansrolle spielten. Das liegt daran, dass sie T-Zell Epitope tragen, die zusätzlich für die Stimulation der T-Helferzellen und darauffolgende Produktion höherwertiger Antikörper notwendig sind [52]. Da Bakteriophagen aber Fremd-DNA und Antibiotikaresistenzen tragen, sind sie für klinische Studien am Patienten nicht geeignet. Unser Ziel war daher, alternative Trägersysteme für die Allergenmimotope zu finden, die ebenfalls immunogene Eigenschaften aufweisen.

Als Alternative wählten wir ABP (ein Albumin-bindendes Protein aus Streptokokken) als Fusionspartner für zwei Mimotope des Birkenhauptallergens Bet v 1 [53, 54]. Es wurden zwei Varianten dieses Fusionsproteins hergestellt, eine divalente und eine monovalente. ABP erwies sich als ein Trägerprotein, das die Immunantwort besonders gut unterstützte, vergleichbar mit derjenigen, die durch Bakteriophagen induziert wurde. Immunisierungen in BALB/c Mäusen verliefen ohne Adjuvans ebenso stark wie mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans, und es wurden IgG1- und IgG2a-Antikörper induziert [55]. Das monovalente Mimotop-ABP war in der Tat in der Lage, IgG-Antikörper gegen das Birkenpollen-Allergen zu induzieren, welche die IgE-Bindung an Bet v 1 inhibierten und daher als blockierende Antikörper fungieren könnten [56]. Darüber hinaus konnte das ABP-Mimotop Fusionsprotein in Hauttesten an allergisierten Mäusen verwendet werden, ohne Typ I Hautreaktionen (Quaddeln) hervorzurufen. Das heißt, dass das Konstrukt zwar IgE-Bindungskapazität besaß, aber durch seine Monovalenz (das Anbieten nur eines IgE Mimotopes) nicht in der Lage war, zwei benachbarte IgE Antikörper kreuzzuvernetzen. Ein herkömmlicher Allergenextrakt hätte hingegen das Risiko einer positiven Reaktion in einem sensibilisierten Individuum getragen.

Zusammenfassend können wir sagen, dass Mimotope einen entscheidenden Impuls für die Entwicklung neuer Konzepte in der Allergenimmuntherapie, basierend auf der B-Zell Immunantwort, darstellen. Der besondere Vorteil einer Immuntherapie mit Mimotopen liegt in der Induktion kontinuierlich verfügbarer blockierender Antikörper im Patienten und sie könnte ähnlich einer Impfung eingesetzt werden.

### **Acknowledgement**

Diese Arbeit wurde von Projekt SFB-F018#8 des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

## Literatur

- Noon L (1911) Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 10: 1572–1573
- Cooke RA, Bernhard JH, Hebdal S, Stul LAJ (1935) Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever). *J Exp Med* 62: 733–751
- Bukantz SC, Lockey RF (2004) Adverse effects and fatalities associated with subcutaneous allergen immunotherapy. *Clin Allergy Immunol* 18: 711–727
- Wurtzen P, Wissenbach M, Ipsen H, Bufer A, Arnved J, van Neerven RJ (1999) Highly heterogeneous Phl p 5-specific T cells from patients with allergic rhinitis differentially recognize recombinant Phl p 5 isoallergens. *J Allergy Clin Immunol* 104: 115–122
- Wurtzen PA (2001) Grass allergen-specific T-cells of atopic patients. *Apmis* 109: 561–571
- Visco V, Dolecek C, Denepoux S, Le Mao J, Guret C, Rousset F, Guinnee MT, Kraft D, Valenta R, Weyer A, Banchereau J, Labecque S (1996) Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1. *J Immunol* 157: 956–962
- Jensen-Jarolim E, Wiedermann U, Ganglberger E, Zurcher A, Stadler BM, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Breiteneder H (1999) Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice. *FASEB J* 13: 1586–1592
- Denepoux S, Eibensteiner PB, Steinberger P, Vrtala S, Visco V, Weyer A, Kraft D, Banchereau J, Valenta R, Lebecque S (2000) Molecular characterization of human IgG monoclonal antibodies specific for the major birch pollen allergen Bet v 1. Anti-allergen IgG can enhance the anaphylactic reaction. *FEBS Lett* 465: 39–46
- Van Regenmortel MHV (1996) Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods* 9: 465–472
- Laver WG, Air GM, Webster RG, Smith-Gill SJ (1990) Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell* 61: 553–556
- Lo Conte L, Chothia C, Janin J (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 285: 2177–2198
- Chakrabarti P, Janin J (2002) Dissecting protein-protein recognition sites. *Proteins* 47: 334–343
- Luzzago A, Felici F, Tramontano A, Pessi A, Cortese R (1993) Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. I. Epitope mapping of human H feritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* 128: 51–57
- Felici F, Luzzago A, Folgori A, Cortese R (1993) Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertussis toxin from phage peptide libraries. *Gene* 128: 21–27
- Folgori A, Tafi R, Meola A, Felici F, Galfre G, Cortese R, Monaci P, Nicosia A (1994) A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *Embo J* 13: 2236–2243
- Riemer A, Scheiner O and Jensen-Jarolim E (2004) Allergen mimotopes. *Methods* 32: 321–327
- Geysen HM, Rodda SJ and Mason TJ (1986) A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* 23: 709–715
- Birkenmeier G, Osman AA, Kopperschlager G, Mothes T (1997) Epitope mapping by screening of phage display libraries of a monoclonal antibody directed against the receptor binding domain of human alpha2-macroglobulin. *FEBS Lett* 416: 193–196
- Myers MA, Davies JM, Tong JC, Whisstock J, Scealy M, Mackay IR, Rowley MJ (2000) Conformational epitopes on the diabetes autoantigen GAD65 identified by peptide phage display and molecular modeling. *J Immunol* 165: 3830–3838
- Suphioglu C, Schappi G, Kenrick J, Levy D, Davies JM, O'Hehir RE (2001) A novel grass pollen allergen mimotope identified by phage display peptide library inhibits allergen-human IgE antibody interaction. *FEBS Lett* 502: 46–52
- Chen YC, Delbrook K, Dealwis C, Mimms L, Mushahwar IK, Mandelk W (1996) Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1997–2001
- Ganglberger E, Grunberger K, Sponer B, Radauer C, Breiteneder H, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E (2000) Allergen mimotopes for 3-dimensional epitope search and induction of antibodies inhibiting human IgE. *FASEB J* 14: 2177–2184
- Enshell-Seijffers D, Denisov D, Groisman B, Smelyanski L, Meyuhas R, Gross G, Denisova G, Gershoni JM (2003) The mapping and reconstitution of a conformational discontinuous B-cell epitope of HIV-1. *J Mol Biol* 334: 87–101
- Kraml G, Riemer AB, Jensen-Jarolim E (2007) Computational Mimotope Surface Matching. submitted for publication
- Cortese R, Felici F, Galfre G, Luzzago A, Monaci P, Nicosia A (1994) Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. *Trends Biotechnol* 12: 262–267
- Demangel C, Maroun RC, Rouyre S, Bon C, Mazie JC, Choumet V (2000) Combining phage display and molecular modeling to map the epitope of a neutralizing antitoxin antibody. *Eur J Biochem* 267: 2345–2353
- Rowley MJ, Scealy M, Whisstock JC, Jois JA, Wijeyewickrema LC, Mackay IR (2000) Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display. *J Immunol* 164: 3413–3419
- Szalai K, Fuhrmann J, Pavkov T, Keller W, Wallmann J, Vrtala S, Scheiner O, Saint-Remy J-M, Neumann D, Pali-Schöll I, Jensen-Jarolim E (2007) Mimotopes identify conformational B-cell epitopes on the two major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2. *Mol Immunol* (in press)
- Mazzucchelli L, Burritt JB, Jesaitis AJ, Nusrat A, Liang TW, Gewirtz AT, Schnell FJ, Parkos CA (1999) Cell-specific peptide binding by human neutrophils. *Blood* 93: 1738–1748
- Vogel M, Miescher S, Biaggi C, Stadler BM (1994) Human anti-IgE antibodies by repertoire cloning. *Eur J Immunol* 24: 1200–1207
- Jarolim E, Rumpold H, Endler AT, Ebner H, Breitenbach M, Scheiner O, Kraft D (1989) IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* 44: 385–395

32. Suphioglu C (2000) What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease? *Clin Exp Allergy* 30: 1335–1341
33. Andersson K, Lidholm J (2003) Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 130: 87–107
34. Vrtala S, Sperr WR, Reimitzer I, van Ree R, Laffer S, Muller WD, Valent P, Lechner K, Rumpold H, Kraft D (1993) cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; characterization of the recombinant Phl pV allergen. *J Immunol* 151: 4773–4781
35. Becker WM, Bufe A, Petersen A, Schlaak M (1995) Molecular characterization of timothy grass pollen group V allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 242–244
36. Hantusch B, Krieger S, Untersmayr E, Schoell I, Knittelfelder R, Flicker S, Spitzauer S, Valenta R, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E (2004) Mapping of conformational IgE-epitopes on Phl p 5a using mimotopes from a phage display library. *J Allergy and Clin Immunol* 114 (6): 1294–1300
37. Foote J, Eisen HN (1995) Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1254–1256
38. Wachholz PA, Soni NK, Till SJ, Durham SR (2003) Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 112: 915–922
39. Simon MR (2004) Anti-idiotype antibodies could explain inhibition of allergen-IgE binding to B cells after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 113: 1225
40. Lichtenstein LM, Holtzman NA, Burnett LS (1968) A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. *J Immunol* 101: 317–324
41. Pecquet C, Murrieta M, Michelen V, Leynadier F, Dry J, Allary M, Fabre G, Saint-Blancard J (1989) Blocking activity of mite-specific IgG antibodies studied by skin tests. *Allergy* 44: 427–431
42. Jarolim E, Poulsen LK, Stadler BM, Mosbech H, Oesterballe O, Kraft D, Weeke B (1990) A long-term follow-up study of hyposensitization with immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 85: 996–1004
43. Birkner T, Rumpold H, Jarolim E, Ebner H, Breitenbach M, Skvaril F, Scheiner O, Kraft D (1990) Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG and IgG subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response. *Allergy* 45: 418–426
44. Ball T, Sperr WR, Valent P, Lidholm J, Spitzauer S, Ebner C, Kraft D, Valenta R (1999) Induction of antibody responses to new B cell epitopes indicates vaccination character of allergen immunotherapy. *Eur J Immunol* 29: 2026–2036
45. Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R (2001) Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 357: 752–756
46. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR (2004) Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 113: 1025–1034; quiz 1035
47. van der Giessen M, Homan WL, van Kernbeek G, Aalberse RC, Dieges PH (1976) Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 50: 625–640
48. Devey ME, Wilson DV, Wheeler AW (1976) The IgG subclasses of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. *Clin Allergy* 6: 227–236
49. Aalberse RC, Dieges PH, Knul-Bretlova V, Vooren P, Aalbers M, van Leeuwen J (1983) IgG4 as a blocking antibody. *Clin Rev Allergy* 1: 289–302
50. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H (1999) The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 29: 896–904
51. Ganglberger E, Grunberger K, Wiedermann U, Vermes M, Sponer B, Breiteneder H, Scheiner O, Boltz G, Jensen-Jarolim E (2001) IgE mimotopes of birch pollen allergen Bet v 1 induce blocking IgG in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 395–397
52. Scholl I, Wiedermann U, Forster-Waldl E, Ganglberger E, Baier K, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Ebner C, Jensen-Jarolim E (2002) Phage-displayed Bet mim 1, a mimotope of the major birch pollen allergen Bet v 1, induces B cell responses to the natural antigen using bystander T cell help. *Clin Exp Allergy* 32: 1583–1588
53. Baumann S, Grob P, Stuart F, Pertlik D, Ackermann M, Suter M (1998) Indirect immobilization of recombinant proteins to a solid phase using the albumin binding domain of streptococcal protein G and immobilized albumin. *J Immunol Methods* 221: 95–106
54. Riemer A, Hantusch B, Sponer B, Kraml G, Hafner C, Zielinski CC, Scheiner O, Pehamberger H and Jensen-Jarolim E (2005) HMW-MAA mimotope immunizations induce antibodies recognizing melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 54: 677–684
55. Hantusch B, Untersmayr E, Schöll I, Krieger S, Wiedermann U, Ganglberger E, Suter M, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E (2004) IgE-mimotopes are safe for immunizations when displayed in a monovalent manner. In: Bienenstock J, Ring J, Togias AG (eds) *Allergy Frontiers and Futures*. Hogrefe & Huber, Cambridge, MA/Toronto/Göttingen/Bern. *Allergy & Clinical Immunology International – Journal of the World Allergy Organization*, Suppl 1, pp 292–297
56. Ganglberger E, Barbara S, Scholl I, Wiedermann U, Baumann S, Hafner C, Breiteneder H, Suter M, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E (2001) Monovalent fusion proteins of IgE mimotopes are safe for therapy of type I allergy. *FASEB J* 15: 2524–2526