

Désensibilisation : y a-t-il une place pour les allergènes recombinants ?

G. Pauli*

Faculté de médecine, université Louis-Pasteur, Inserm U425 et service de pneumologie, hôpital Lyautey, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, BP 426, 67091 Strasbourg cedex, France

Résumé

L'immunothérapie spécifique est le seul traitement étiologique de l'allergie IgE médiée conduisant à une modulation de la réponse immune vis-à-vis de l'allergène impliqué. Les extraits allergéniques utilisés actuellement sont hétérogènes et variables dans leur composition et leur contenu en allergènes majeurs et mineurs. Le clonage des protéines allergéniques a permis leur production sous forme recombinante, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques. Dans les désensibilisations conventionnelles, l'utilisation d'allergènes recombinants permettrait d'adapter les traitements de désensibilisation aux spectres de spécificité des IgE des patients et de mieux quantifier les doses injectées. Le futur de l'immunothérapie devrait comporter l'utilisation de peptides et de dérivés hypoallergéniques des allergènes recombinants dont le but est d'assurer une efficacité accrue du traitement et une diminution des effets secondaires. Au cours des cinq dernières années, de nombreux travaux expérimentaux ont été effectués pour les allergènes les plus importants, en utilisant différentes approches : traitement par des peptides correspondant seulement aux épitopes T, sélection de molécules allergéniques correspondant à des isoformes n'ayant pas de réactivité vis-à-vis des IgE, production de dérivés d'allergènes recombinants rendus hypoallergéniques par réduction de la densité ou de l'accessibilité des épitopes B, ou par modification de leurs séquences B les plus importantes par mutation dirigée ou clivage de ponts disulfures, synthèse de polypeptides recombinants correspondant aux épitopes B. Ces différentes molécules hypoallergéniques ont été sélectionnées par des travaux expérimentaux utilisant des cellules de sujets sensibilisés, par des techniques d'inhibition compétitives utilisant des sérums provenant de sujets sensibilisés à l'allergène naturel, et par des études in vivo en effectuant des tests cutanés. Seuls des essais cliniques de désensibilisation effectués avec des peptides synthétiques correspondant aux épitopes T ont été publiés. © 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

désensibilisation / allergènes recombinants / immunothérapie

Summary – Immunotherapy: is there a place for recombinant allergens?

Specific immunotherapy is the sole etiologic mode of treatment in allergic diseases, leading to modulation of the immune response against allergens. Extracts of natural allergen sources currently used in clinical practice are heterogeneous and their composition and content in major and minor allergens are variable. Cloning of allergenic proteins is the starting point for the development of recombinant allergens offering new therapeutic perspectives in immunotherapy. In conventional immunotherapy

*Correspondance et tirés à part.
Adresse e-mail : Gabrielle.Pauli@chru-strasbourg.fr (G. Pauli).

the use of recombinant allergens should allow the adequate adaptation of immunotherapy to the specific IgE sensitization of each allergic patient and the quantification of the dosage of major and minor allergens in allergen preparations. The use of peptides and engineered hypoallergens for immunotherapy should lead to better efficacy and greater safety by reducing the risk of anaphylactic side reactions. Over the last 5 years, several studies have been performed with peptides and modified recombinant allergens derived from the most important allergens, using various approaches: treatment with peptides representing a portion of T cell epitopes, selection of isoforms of allergen molecules identified on the basis of low/no IgE binding activity, production of hypoallergenic derivatives using recombinant technology (allergenic fragments and recombinant oligomers where conformational B epitopes are lost or hidden, modification of important amino-acid sequences by site-directed mutagenesis and destruction of disulfide bonds either in IgE binding epitopes or at sites outside the epitopes influencing the conformation of the molecules and thereby the IgE binding activity), synthesis of peptides corresponding to portions of B cell epitopes. All these engineered hypoallergens have been selected by experimental animal studies and in vitro studies using T lymphocytes from allergic patients, and sera to assess loss of IgE reactivities by RAST-EIA and IgE inhibition assay; in vivo studies were also performed in sensitized patients using cutaneous tests. Desensitization efficacy studies were only performed with peptides derived from T cell epitopes. © 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

desensitization / recombinant allergens / specific immunotherapy

L'immunothérapie spécifique est le seul traitement étiologique de l'allergie IgE médiée qui conduit à une modulation de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'allergène impliqué. Les bases du traitement de désensibilisation n'ont pas fondamentalement changé depuis les premières publications faites par Noon [1] sur le traitement par inoculation préventive du rhume des foins. L'immunothérapie spécifique consiste à administrer de faibles doses d'allergènes, progressivement croissantes, afin d'éviter la survenue de réactions anaphylactiques. Il est actuellement reconnu que son efficacité dépend de la qualité et de la quantité totale d'allergène administré [2]. Bien que les mécanismes de l'immunothérapie ne soient pas complètement élucidés, il semble que les points clés sont le déplacement de la réponse immunitaire de type Th2 vers un type Th1, la production de cytokines suppressives, l'augmentation des taux d'IgG pouvant elle être considérée comme un marqueur de la réponse immunologique à l'allergène [3]. La compréhension des processus immunologiques qui sous-tendent l'immunothérapie spécifique, a permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques parmi lesquelles l'utilisation d'allergènes recombinants apparaît comme primordiale.

INCONVÉNIENTS DES EXTRAITS ALLERGÉNIQUES UTILISÉS ACTUELLEMENT POUR L'IMMUNOTHÉRAPIE SPÉCIFIQUE

Les extraits allergéniques « naturels » proviennent de sources naturelles complexes telles que les pollens, les acariens et leur milieu de culture, les moisissures, les épithéliums animaux. Ils sont utilisés pour le diagnostic et les traitements de désensibilisation, et contiennent à la fois des molécules allergéniques et non allergéniques. Ils sont hétérogènes et variables dans leur composition et dans leur contenu en allergènes. Ils peuvent être contaminés par des allergènes provenant d'autres sources naturelles [4] et peuvent contenir des enzymes protéolytiques, ces enzymes étant susceptibles d'entraîner une diminution du potentiel allergénique des extraits utilisés pour l'immunothérapie spécifique [5]. Le contenu en molécules allergéniques d'un extrait dépend également des procédés d'extraction et de purification utilisés. Certains allergènes peuvent ne pas être hydrosolubles et ne seront pas isolés avec les techniques classiques. La production d'extraits allergéniques reproductibles impose aux producteurs de lourdes contraintes pour effectuer les travaux de standardi-

sation des extraits allergéniques ; seuls les extraits allergéniques correspondant aux pneumallergènes pour lesquels les prévalences de sensibilisations sont élevées, sont validés par des méthodes de standardisation *in vitro* et *in vivo*. Depuis 1988, date où le premier allergène majeur de *Dermatophagoides pteronyssinus* fut cloné [6], un grand nombre d'allergènes majeurs et mineurs ont été clonés. La prévalence des sensibilisations vis-à-vis de certaines de ces molécules a été évaluée parmi des populations d'allergiques sensibilisés aux allergènes naturels. Cependant, le contenu en allergènes majeurs des extraits naturels n'a été précisé que très récemment dans des études cliniques étudiant l'efficacité des désensibilisations. Les tests à visée diagnostique, utilisant les extraits actuels, ne permettent pas de préciser à quelle molécule le patient est sensibilisé, ils ne permettent pas non plus de mesurer la quantité d'IgE spécifiques produites vis-à-vis de chaque composant moléculaire et d'évaluer quantitativement le pourcentage que représentent ces IgE spécifiques parmi les IgE polyclonales dirigées contre l'extrait naturel.

APPORT DES ALLERGÈNES RECOMBINANTS [7-9]

Plus de 400 allergènes sont actuellement disponibles dans les banques de données [10] ; la plupart d'entre eux ont été produite sous forme recombinante, utilisant le plus souvent des systèmes d'expression bactériens (*E. coli*), mais aussi des levures, des virus, des cellules d'insectes. La structure tridimensionnelle d'un certain nombre d'allergènes courants a été déterminée en utilisant des techniques de résonance magnétique nucléaire, de cristallographie et des modélisations (*computer based molecular modeling*) : par exemple, rBet v 1 [11], allergène majeur du bouleau ; rDer p 1 et rDer p 2 [12, 13], allergènes majeurs des acariens ; rEqu c 1 [14], allergène majeur du cheval ; rAra h [15], allergène majeur de l'arachide. Le clonage des allergènes et l'analyse de leur conformation ont permis l'étude des épitopes T et B : les épitopes T dépendent de la structure primaire de la molécule allergénique, alors que les épitopes B sont le plus souvent dépendants de sa conformation dans l'espace. La possibilité de produire des protéines recombinantes couvrant les différentes séquences d'un allergène ou des protéines avec des struc-

tures tridimensionnelles modifiées, a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques.

La production en grandes quantités d'allergènes sous forme recombinante est maintenant possible : par exemple, 10 mg d'allergène recombinant de rBet v 1 peuvent être produits par litre de culture d'*Escherichia coli* [16]. Les systèmes d'expression procaryote (plasmide bactérien) ne permettent pas toujours d'obtenir les glycosylations post-traductionnelles des polypeptides qui ont un intérêt majeur dans l'acquisition d'une conformation active ; aussi est-il impératif de valider l'activité immunologique des allergènes recombinants par rapport à celle des allergènes naturels correspondants, en utilisant des sérums ou des cellules provenant de sujets sensibilisés à l'allergène naturel. Plusieurs études *in vivo* ont été réalisées : elles ont montré que les prick-tests effectués avec les allergènes recombinants de bouleau, de graminées, d'oléacées, d'acariens, étaient capables d'induire des tests positifs chez des groupes importants de patients allergiques à des concentrations variant de 1 à 10 µg/mL [17-20]. L'utilisation des allergènes recombinants permet d'identifier les protéines allergéniques auxquelles le patient est sensibilisé et d'établir ainsi pour chaque patient le spectre des spécificités des IgE (spectrotype). Il devient alors possible de proposer à chaque patient un traitement sur mesure, adapté à son profil allergénique [21]. Enfin, les allergènes recombinants permettant d'évaluer quantitativement les IgE spécifiques dirigées contre la protéine allergénique vont permettre de suivre leur évolution au cours de l'exposition naturelle et au cours des traitements de désensibilisation [22]. Les allergènes recombinants représentent également une avancée dans la connaissance des allergènes croissants. Ils permettent d'améliorer l'interprétation des sensibilisations concomitantes à plusieurs extraits allergéniques (les extraits actuellement disponibles correspondant forcément à des mélanges de familles moléculaires différentes) [23]. Les avantages des allergènes recombinants sont énumérés dans le [tableau 1](#).

PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES

Utilisation des allergènes recombinants dans les désensibilisations conventionnelles

Les progrès apportés dans le diagnostic allergologique par les allergènes recombinants pourraient abou-

Tableau I. Avantages des allergènes recombinants.

Production d'extraits ayant une activité allergénique constante
Élimination des problèmes de standardisation des extraits allergéniques
Production d'extraits ne contenant que les allergènes pertinents
Élimination de protéines « contaminantes » (autres allergènes, protéines non allergéniques)
Absence du risque de contamination par des agents infectieux
Possibilité de production de dérivés d'allergènes recombinants ayant une activité allergénique réduite (diminution du risque d'effets secondaires)

tir à des désensibilisations mieux ciblées se fondant sur le profil de sensibilisation de chaque patient, ce qui a été appelé par Valenta *component-resolved immunotherapy* [21]. Ils pourraient, par exemple, conduire à l'utilisation chez certains patients d'un allergène « mineur » n'ayant par ailleurs qu'une faible prévalence dans les sensibilisations induites par un extrait naturel dans une population d'atopiques. Seules quelques sources d'allergènes pourraient se résumer à l'emploi d'une seule molécule recombinante : à titre d'exemple rBet v 1 pour les pollens de fagales, rFel d 1 pour les allergènes de chat, l'importance de monosensibilisations à ces allergènes majeurs ayant été démontrée dans de larges groupes de patients sensibilisés au pollen de bouleau [17, 24] et de chat [25]. Elle permettrait d'éviter l'injection de molécules allergéniques auxquelles le patient n'est pas sensibilisé. Enfin, la dose d'allergène injectée serait réellement quantifiée, les doses d'entretien proposées se situant entre 5 et 50 µg d'allergènes majeurs [2]. À ce jour, aucun essai thérapeutique n'a comparé une désensibilisation effectuée avec un allergène recombinant tel que rBet v 1 à une désensibilisation effectuée avec un extrait naturel de bouleau.

Utilisation de dérivés d'allergènes recombinants ayant une activité allergénique réduite

Diverses approches ont été utilisées afin de diminuer la capacité des allergènes recombinants à lier les IgE, tout en stimulant les cellules T : traitement par des peptides recombinants correspondant seulement aux épitopes T, cette technique ayant entraîné chez l'animal une diminution de la réactivité à des allergènes de chat et d'acarien [26, 27], sélection d'isoformes n'ayant pas de réactivité vis-à-vis des IgE, réduction de la densité des épitopes B qui sont le plus souvent

discontinus et dépendent de la structure spatiale de la molécule d'allergène, réduction de l'accessibilité aux épitopes B, modification des séquences épitopiques importantes des épitopes B par mutation dirigée ou clivage de ponts disulfures, synthèse de polypeptides recombinants correspondant aux épitopes B.

Le [tableau II](#) indique de manière synthétique les recherches expérimentales effectuées pour différents allergènes majeurs au cours des cinq dernières années, en précisant pour chacun d'entre eux les objectifs visés au niveau des épitopes T ou B.

Les peptides et les dérivés des allergènes recombinants devraient entraîner une efficacité accrue de l'immunothérapie spécifique, avec une diminution des effets secondaires. Ces molécules devraient permettre une interaction des cellules T et une diminution du risque de pontage des IgE par les molécules allergéniques à l'origine de la dégranulation des cellules cibles, les basophiles et les mastocytes. La démonstration que ces molécules ont une activité réduite en ce qui concerne leur liaison avec les IgE, tout en conservant leurs épitopes T, a été effectuée par des techniques *in vitro* et *in vivo*. Les études *in vitro* comportent la stimulation de clones de cellules T provenant de sujets sensibilisés à l'allergène naturel par les allergènes modifiés, et la mise en évidence de la réduction de leur capacité à se fixer sur des IgE spécifiques provenant de sujets sensibilisés à l'allergène naturel. Nous ne reprendrons en détail que les études qui font état de résultats cliniques (évaluation de l'allergénicité réduite de ces molécules par des tests cutanés ou essai clinique de désensibilisation).

En ce qui concerne la synthèse de polypeptides recombinants correspondant à des épitopes T, des expérimentations ont débuté dès le début des années 1990, avec des polypeptides synthétiques dérivés de séquences d'acides aminés de la chaîne 1 de Fel d 1 utilisée à trois concentrations différentes en injections hebdomadaires pendant quatre semaines. Les patients ayant eu les doses les plus élevées (750 µg) avaient une réduction des symptômes six semaines après la dernière injection ; des effets secondaires observés chez 16 sur 24 sujets ayant eu la dose la plus élevée ont fait renoncer à des études de phase III [28]. Une autre étude utilisant trois peptides T de l'allergène de ragweed (huit injections avec 250 µg de peptides) a abouti au même résultat [51]. Des études préliminaires ont également montré qu'un mélange de 12 peptides correspondant aux chaînes 1 et 2 de Fel d 1,

Tableau II. Récapitulatif des travaux expérimentaux et des études in vivo effectuées avec des peptides synthétiques et des dérivés hypoallergéniques d'allergènes recombinants.

<i>Allergènes majeurs</i>	<i>Sources</i>	<i>Peptides synthétiques et dérivés d'allergènes recombinants</i>		<i>Références</i>
		<i>Épitopes T</i>	<i>Épitopes B</i>	
Fel d 1	Chat	Mélange de peptides T immunodominants provenant de la chaîne I Mélange de 12 peptides T (15-17 AA) provenant des chaînes I et II	Absent	28
Fel d 1	Chat		Absent	29
Phospholipase A2	Venin d'abeille	Mélange de peptides T (50-60 AA) couvrant la quasi totalité des épitopes T	Absent	30, 31
rApi m 1				
Bet v 1	Pollen de bouleau	Isoformes (contiennent tous les épitopes T)	Absent	32, 33
Bet v 1	Pollen de bouleau	Fragments d'allergènes : tous les épitopes T sont conservés	Minimum d'épitopes B conservé	34–38
Bos d 2	Bovin			
Bet v 1	Pollen de bouleau	Oligomères : conservation de tous les épitopes T	Minimum d'épitopes B conservé (accessibilité réduite)	39, 36, 37
Antigène 5s	Venin de poliste et de guêpe	Hybride comportant des portions des deux molécules de l'antigène 5s des deux venins.	Conservation d'épitopes B mais à faible concentration	40
Lep d 2	Acarien	Tous les épitopes T sont conservés	Mutation ponctuelle de résidus cystéines entraînant une rupture des ponts disulfures et une destruction des épitopes B conformationnels	41–45
Der f 2	Acarien			
Der p 2	Acarien			
Par j 1	Pollen de pariétaire			
Bos d 2	Bovin			
Phl p 5	Pollen de phléole	Tous les épitopes T sont conservés	Délétion – mutation au niveau des épitopes B immunodominants	46
Der f 2	Acarien	Mélange de fragments : tous les épitopes T sont conservés	Mutation ponctuelle entraînant une rupture des ponts disulfures et une destruction des épitopes B conformationnels	47
Phl p 1	Pollen de phléole	Absent	Peptides correspondant aux épitopes B mais ne se liant pas aux IgE	48–50
Bet v 1	Pollen de bouleau	Absent		

injecté en intradermoréaction, était susceptible ultérieurement d'entraîner la disparition des réactions retardées cutanées et bronchiques que ces peptides avaient induites initialement [29]. Le désavantage majeur des peptides T est la difficulté d'établir le profil épitopique T pour chaque patient, qui est variable et qui dépend également des antigènes d'histocompatibilité. Aussi, la conception de molécules contenant tous les épitopes T possibles d'un allergène majeur et rendus hypoallergéniques paraît plus prometteuse pour les applications cliniques. Des essais in vitro ont été effectués dans ce sens avec la phospholipase A2 en utilisant des peptides de 50 à 60 aci-

des aminés recouvrant la totalité de la séquence de cet allergène [30]. L'efficacité de l'injection de trois peptides T correspondant à la phospholipase A a été établie dans un nombre restreint de patients, montrant une protection totale après une provocation réaliste chez trois patients sur cinq et partielle chez les deux autres [31].

Les molécules allergéniques naturelles peuvent être présentes sous forme de différents isoformes dans l'extrait allergénique et bien que n'ayant que de minimales différences dans leur structure primaire avec l'allergène, ces variants moléculaires peuvent avoir des réactivités immunologiques différentes. Si elles

ont les mêmes potentialités à stimuler les clones de cellules T et que, en revanche, elles n'ont pas la capacité de se lier aux IgE spécifiques humaines, elles pourraient être des candidats à des désensibilisations dans le futur. Ferreira et al. [32] ont ainsi étudié 13 isoformes de Bet v 1 parmi lesquelles Bet v 1d, ne différant que de sept acides aminés de Bet v 1a donne des réactions cutanées négatives ou très faiblement positives chez des sujets sensibilisés au bouleau. Ces travaux ont été confirmés et la diminution de l'allergénicité de Bet v 1d par rapport à Bet v 1a, évaluée par des intradermoréactions atteint un facteur 100, le test de provocation conjonctival restant négatif chez 48 patients testés avec Bet v 1d, alors qu'il était positif chez 38 sur 48 patients avec Bet v 1a [33].

Des fragments d'allergènes permettent également de conserver l'ensemble des épitopes T et la perte de la structure tertiaire entraîne théoriquement une altération des épitopes B conformationnels. Cette technique a été utilisée pour Bet v 1 [34] et également pour Bos d 2 [35]. Deux études cliniques ont montré des diminutions d'au moins 100 fois de l'allergénicité des fragments par rapport à l'allergène rBet v 1 [36, 37]. Cependant, les résultats obtenus par les tests cutanés doivent encore être confirmés par des essais cliniques de désensibilisation, car on ne peut pas exclure la possibilité de nouvelles sensibilisations à des épitopes B non conformationnels.

La synthèse de polymères comprenant des copies d'un allergène majeur (Bet v 1 dimères et Bet v 1 trimères) a été réalisée [39]. Ces molécules gardent une bonne immunogénicité, mais leur activité allergénique est réduite, peut-être par une diminution de l'accessibilité ou une réorientation des épitopes B. L'intensité des tests cutanés effectués avec les dimères et les trimères était au moins 100 fois inférieure à celle induite par la molécule rBet v 1 non modifiée [36, 37].

La fabrication d'hybrides contenant des portions de molécules d'antigènes 5s, molécules ayant une forte homologie dans les venins de *Vespula vulgaris* et de guêpe poliste mais n'ayant qu'une faible allergénicité croisée chez les sujets allergiques, a permis à King et al. [40] de proposer des molécules ayant la même structure spatiale, avec conservation des épitopes conformationnels mais en les utilisant à une concentration réduite. La réactivité cutanée vis-à-vis de l'antigène 5s était réduite de 100 à 1 000 fois [40].

L'introduction de mutations ponctuelles, en dehors des épitopes B liant les IgE spécifiques, modifie la structure spatiale de la molécule et peut faire disparaître les épitopes B ayant une structure conformationnelle. Cette modification peut se faire par des mutations de résidus cystéines, ce qui supprime la possibilité de formation de ponts disulfures. Ainsi, pour les allergènes Der p 2 [43], Der f 2 [42, 47], Lep d 2 [41] et Par j 1 [44], une réduction de leur activité allergénique *in vivo* a été observée lorsque ces modifications étaient effectuées. L'introduction de mutations au niveau des aminoacides qui forment un épitope peut également diminuer l'allergénicité. Les délétions d'acides aminés ou leurs substitutions peuvent être multiples et rendre une molécule hypoallergénique, comme cela a été montré avec Phl p 5, les tests cutanés étant nettement diminués [46].

Les épitopes B eux-mêmes constituent une voie de recherche pour de nouvelles formes de désensibilisation. L'étude des épitopes B reconnus par les IgE humaines a montré qu'il existait une hétérogénéité dans les spécificités des anticorps induits par un allergène majeur. Les polypeptides recombinants correspondant aux épitopes B immunodominants d'un allergène majeur peuvent être synthétisés et pourraient constituer de nouveaux vaccins pour la désensibilisation spécifique. Dans un travail récent, Focke et al. [49] ont sélectionné cinq peptides recombinants de l'allergène Phl p 1, constitués de 28 à 32 acides aminés (ce qui correspond à une taille non immunogène) et ont étudié leur allergénicité chez des sujets sensibilisés aux graminées et leur potentialité à produire des anticorps spécifiques chez l'animal. Des expériences d'inhibition compétitive d'un des peptides, P5, étaient particulièrement efficaces dans l'inhibition des IgE anti-Phl p 1.

L'adjonction aux allergènes recombinants d'adjuvants Th1 (extraits bactériens, interleukine 12) ou l'immunisation génique par insertion de séquences codantes d'un allergène majeur dans un ADN plasmidique avec adjonction ou non de séquence cpG [52, 53] sont d'autres voies visant à moduler la réponse allergique.

CONCLUSION

Des efforts considérables ont été effectués au cours des dernières années pour la caractérisation moléculaire des allergènes. La gamme de molécules hypoallergéniques proposée à l'heure actuelle est le fruit de

travaux expérimentaux effectués chez l'animal, de techniques d'inhibition compétitive utilisant des sérums de sujets sensibilisés à l'allergène naturel et d'études in vivo chez des sujets sensibilisés soumis à des tests cutanés. Les étapes ultérieures devraient permettre de sélectionner les molécules qui seront les meilleurs candidats pour les désensibilisations du futur et qui auront le moins d'effets secondaires. Le champ d'investigation des cliniciens est considérable, car seuls des essais cliniques contrôlés effectués selon les bonnes pratiques de la désensibilisation pourront confirmer les données existantes.

RÉFÉRENCES

- Noon L. Prophylactic inoculation for hay fever. *Lancet* 1911 ; i : 1572.
- Bousquet J, Lockey R, Malling H. Allergen immunotherapy : therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998 ; 102 : 558-62.
- Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998 ; 102 : 157-64.
- Van Der Veen MJ, Mulder M, Witteman AM, van Ree R, Aalberse RC, Jansen HM, et al. False-positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996 ; 98 : 1028-34.
- Nelson HS, Ikke D, Buchmeier A. Studies of allergen extract stability : the effects of dilution and mixing. *J Allergy Clin Immunol* 1996 ; 98 : 382-8.
- Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, Chua KY, Plozza TM, Dilworth RJ, et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988 ; 85 : 127-9.
- Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomes A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ; 106 : 409-18.
- Thomas WR, Smith W. Towards defining the full spectrum of important house dust mite allergens. *Clin Exp Allergy* 1999 ; 29 : 1583-7.
- Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Curr Opin Immunol* 1995 ; 7 : 751-6.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Research* 2000 ; 28 : 15-8.
- Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, et al. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origine of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* 1996 ; 3 : 1040-5.
- Topham CM, Srinivasan N, Thorpe CJ, Overington JP, Kalsheker NA. Comparative modelling of major house dust mite allergen Der p 1 : structure validation using an extended environmental amino acid propensity table. *Protein Eng* 1994 ; 7 : 869-94.
- Mueller GA, Benjamin DC, Rule GS. Tertiary structure of the major house dust mite allergen Der p 2 : sequential and structural homologies. *Biochemistry* 1998 ; 37 : 12707-14.
- Lascombe MB, Gregoire C, Poncet P, Tavares GA, Rosinski-Chupin I, Rabillon J, et al. Crystal structure of the allergen Equ c 1 : a dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 21572-7.
- Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, et al. Structure of the major peanut allergen, Ara h 1, may protect IgE binding epitopes from degradation. *J Immunol* 2000 ; 164 : 5844-9.
- Hoffmann-Sommergruber K, Susani M, Ferreira F, Jertschin P, Ahorn H, Steiner R, et al. High-level expression and purification of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Protein Exp Purif* 1997 ; 9 : 33-9.
- Pauli G, Oster JP, Deviller P, Heiss S, Bessot JC, Susani M, et al. Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2 : diagnostic value for birch pollen and associated allergies. *J Allergy Clin Immunol* 1996 ; 97 : 1100-9.
- Heiss S, Mahler V, Steiner R, Spitzauer S, Schweiger C, Kraft D, 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 : 830-7.
- Quiralte J, Gonzalez E, Arias De Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Saenz De San Pedro B, et al. Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with *Olea europaea* pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2000 ; 122 : 101-7.
- Kronqvist M, Johansson E, Magnusson CGM, Olsson S, Eriksson TL, Gafvelin G, et al. Skin prick test and serological analysis with recombinant group 2 allergens of the dust mites *L. destructor* and *T. putrescentiae*. *Clin Exp Allergy* 2000 ; 30 : 670-6.
- 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.
- Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, Van Wijk RG, De Jong N, Brewczynski PZ, et al. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1,2,3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1997 ; 27 : 68-74.
- Pauli G. Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens : the role of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000 ; 123 : 183-95.
- Menz G, Dolecek C, Schonheit-Kenn U, Ferreira F, Moser M, Schneider T, et al. Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 1996 ; 26 : 50-60.
- Van Ree R, Van Leeuwen A, Bulder I, et al. Purified natural and recombinant Fel d 1 and cat albumin in vitro diagnostics for cat allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 104 : 1223-30.
- Briner TJ, Kuo M, Keating KM, Rodgers B, Greenstein J. 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 : 7608-16.
- 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.
- Norman PS, Ohman JL, Long AA, Creticos BS, Gefter MA, Shaked Z, et al. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am J Resp Crit Care Med* 1996 ; 154 : 1623-8.
- 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.
- Kämmerer R, Kettner A, Chvatchko Y, Dufour N, Tiercy JM, Corradin G, et al. Delineation of PL (2) epitopes using short or long overlapping synthetic peptides : interest for specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1997 ; 27 : 1016-26.
- Muller U, Akdis CA, Fricker M, Akdis 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.
- Ferreira F, Hirtenlehner K, Jilek A, Godnik-Cvar J, Breiteneder H, Grimm R, 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.

- 33 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.
- 34 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.
- 35 Zeiler T, Taivainen A, Rytönen M, 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.
- 36 Van Hage-Hamsten M, Kronqvist M, Zetterstrom D, Johansson E, Niederberger V, Vrtala S, 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.
- 37 Pauli G, Purohit A, Oster JP, de Blay F, Vrtala S, Niederberger V, et al. Comparison of genetically engineered hypoallergenic r Bet v 1 derivatives with r Bet v 1 wild-type by skin prick and intradermal testing : results obtained in a French population. *Clin Exp Allergy* 2000 ; 30 : 1076-84.
- 38 Nopp A, Hallden G, Lundahl J, Johansson E, Vrtala S, Valenta R, et al. Comparison of inflammatory responses to genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1 and to recombinant Bet v 1 wild type in skin chamber fluids collected from birch pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ; 106 : 101-9.
- 39 Vrtala S, Hirtenlehner K, Susani M, Hufnagl P, Binder BR, Vangelista L, et al. Genetic engineering of recombinant hypoallergenic oligomers of the major birch pollen allergen, Bet v 1 : candidates for specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999 ; 118 : 218-9.
- 40 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.
- 41 Olsson S, Van Hage-Hamsten M, Whitley P. Contribution of disulfide bonds to antigenicity of Lep d 2, the major allergen of the dust mite *Lepidoglyphus destructor*. *Mol Immunol* 1998 ; 35 : 1017-23.
- 42 Takai T, Yokota T, Yasue M, Nishiyama C, Yuuki T, Mori A, et al. Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. *Nature Biotechnology* 1997 ; 15 : 754-8.
- 43 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.
- 44 Bonura A, Amoroso S, Locorotondo G, Di Felice G, Tinghino R, Geraci D, et al. Hypoallergenic variants of the *Parietaria judaica* major allergen Par j 1 : a member of the non-specific lipid transfer protein plant family. *Int Arch Allergy Immunol* 2001 ; 126 : 32-40.
- 45 Kauppinen J, Zeiler T, Rautiainen J, Rytönen-Nissinen M, Taivainen A, Mantyjarvi R, et al. Mutant derivatives of the main respiratory allergen of cow are less allergenic than the intact molecule. *Clin Exp Allergy* 1999 ; 29 : 989-96.
- 46 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.
- 47 Takai T, Mori A, Yuuki T, Okudaira H, Okumura Y. Non-anaphylactic combination of partially deleted fragments of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. *Molecular Immunology* 1999 ; 36 : 1055-65.
- 48 Ball T, Fuchs T, Sperr WR, Valent P, Vangelista L, Kraft D, et al. B cell epitopes of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 1, revealed by gene fragmentation as candidates for immunotherapy. *FASEB J* 1999 ; 13 : 1277-90.
- 49 Focke M, Mahler V, Ball T, Sperr WR, Majlesi Y, Valent P, et al. Non-anaphylactic 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.
- 50 Focke M, Mahler V, Ball T, Kraft D, Valenta R. Nonallergenic peptides from surface-exposed areas or B-cell epitopes of allergens for specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001 ; 124 : 398-9.
- 51 Creticos PS, Hebert J, Philip G. Allerwax Ragweed Study Group. Efficacy of Allervax ragweed peptides in the treatment of ragweed-induced allergy [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 1997 ; 99 : 1631.
- 52 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.