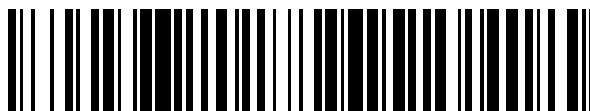


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 440**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2003** **E 03738256 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 1513873**

54 Título: **Epítomos terapéuticos y sus usos**

30 Prioridad:

**05.06.2002 GB 0212885**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**21.10.2014**

73 Titular/es:

**ISIS INNOVATION LIMITED (100.0%)  
EWERT HOUSE, EWERT PLACE  
SUMMERTOWN, OXFORD OX2 7SG, GB**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, R. P.;  
HILL, A. V. S. y  
JEWELL, DEREK PARRY**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 510 440 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Epítomos terapéuticos y sus usos

- 5 La invención se refiere a epítomos útiles en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celíaca, incluyendo diagnóstico, tratamiento, kits, y métodos de uso de lo anterior.

Una reacción inmunológica a la gliadina (un componente del gluten) en la dieta provoca la enfermedad celíaca. Es sabido que las respuestas inmunitarias en el tejido intestinal responden preferentemente a la gliadina que ha sido  
 10 modificada por una transglutaminasa intestinal. La enfermedad celíaca se diagnostica mediante la detección de anticuerpos dirigidos contra el endomisio, pero esto requiere confirmación mediante el hallazgo de inflamación linfocítica en biopsias intestinales. La obtención de dicha biopsia es un inconveniente para el paciente.

Los investigadores hasta ahora han asumido que únicamente las respuestas de los linfocitos T intestinales  
 15 proporcionan una indicación precisa de la respuesta inmunitaria contra gliadinas. Por tanto, se han concentrado en la investigación de las respuestas de los linfocitos T en tejido intestinal<sup>1</sup>. Se conocen<sup>2</sup> los epítomos de gliadina que requieren la modificación por transglutaminasa (antes de que sean reconocidos por el sistema inmunitario).

Los inventores han encontrado el epítomo inmunodominante de A-gliadina para linfocitos T reconocido por el sistema  
 20 inmunitario en la enfermedad celíaca, y han demostrado que es reconocido por los linfocitos T en la sangre periférica de individuos con enfermedad celíaca (véase, documento WO 01/25793). Se ha comprobado que dichos linfocitos T están presentes con una frecuencia suficientemente alta para ser detectables sin reestimulación (es decir, se podría usar un sistema de detección de "respuesta primaria"). El epítomo se identificó usando un método basado en la clonación de células no T que proporciona un reflejo más preciso de los epítomos reconocidos. El epítomo  
 25 inmunodominante requiere la modificación por transglutaminasa (provocando la sustitución de una glutamina particular por glutamato) antes del reconocimiento por el sistema inmunitario.

En base a este trabajo, los inventores han desarrollado un ensayo que se puede usar para diagnosticar la enfermedad celíaca en una fase temprana. El ensayo se puede llevar a cabo sobre una muestra de sangre periférica  
 30 y por tanto no es necesaria una biopsia intestinal. El ensayo es más sensible que los ensayos con anticuerpos que se usan en la actualidad.

Mediante el mapeo integral de los epítomos de gliadina de trigo para linfocitos T (véase Ejemplo 13), los inventores también han encontrado epítomos bioactivos en la enfermedad celíaca en pacientes HLA-DQ2+ en otras gliadinas de  
 35 trigo, que tienen secuencias centrales similares (por ejemplo, SEQ ID NO: 18-22) y secuencias de longitud completa similares (por ejemplo, SEQ ID NO: 31-36), al igual que en secalinas de centeno y hordeínas de cebada (por ejemplo, SEQ ID NO: 39-41); véase también las Tablas 20 y 21. Además, se han identificado varios epítomos bioactivos en la enfermedad celíaca en pacientes HLA-DQ8+ (por ejemplo, SEQ ID NO: 42-44, 46). Este mapeo integral proporciona de esta forma los epítomos dominantes reconocidos por los linfocitos T en pacientes celíacos.  
 40 Los métodos de la invención descritos en este documento se pueden llevar a cabo usando el epítomo adicional identificado que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 19 o una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por una transglutaminasa de la secuencia SEQ ID NO: 19. Es decir, los agentes de la invención involucran este nuevo epítomo.

45 La invención también proporciona el uso del agente para la preparación de un medio diagnóstico para su uso en un método de diagnóstico de la enfermedad celíaca, o de susceptibilidad a la enfermedad celíaca, en un individuo, dicho método que comprende la determinación de si los linfocitos T del paciente reconocen el agente, dónde el reconocimiento por parte de los linfocitos T indica que el paciente tiene, o es susceptible a, la enfermedad celíaca.

50 El hallazgo de un epítomo inmunodominante que es modificado por la transglutaminasa (así como los otros epítomos adicionales definidos en este documento) también permite el diagnóstico de la enfermedad celíaca en base a la determinación de si hay presentes otros tipos de respuestas inmunitarias a este epítomo. Así, la invención también proporciona un método de diagnóstico de la enfermedad celíaca, o de susceptibilidad a la enfermedad celíaca en un individuo, que comprende la determinación de la presencia de un anticuerpo que se une al epítomo en una muestra  
 55 procedente del individuo, donde la presencia del anticuerpo indica que el individuo tiene, o es susceptible a, la enfermedad celíaca.

La invención además proporciona el agente, opcionalmente asociado a un vehículo, para su uso en un método de tratamiento o prevención de la enfermedad celíaca mediante la inducción de tolerancia de los linfocitos T que

reconocen el agente. Además se proporciona el agente para su uso en un método de tratamiento o prevención de la enfermedad celíaca en un individuo mediante la inducción de tolerancia del individuo para prevenir la producción de dicho anticuerpo.

- 5 La invención proporciona un método para determinar si una composición es capaz de provocar la enfermedad celíaca, que comprende la determinación de si hay presente en la composición una proteína que se pueda modificar mediante una transglutaminasa en una secuencia de oligopéptidos como se ha definido anteriormente, donde la presencia de la proteína indica que la composición es capaz de provocar la enfermedad celíaca.

## 10 Resumen de la invención

La presente invención proporciona un péptido aislado que comprende al menos un epítipo para linfocitos T, en el que el epítipo tiene una longitud no superior a 50 aminoácidos y el epítipo para linfocitos T comprende una secuencia seleccionada entre FPQPQQPFP y una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por  
15 una transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP (el "péptido de la invención").

La presente invención también proporciona un péptido de la invención, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, para su uso en un método de tratamiento.

20 La presente invención también proporciona una composición que comprende (a) un péptido de la invención, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, y (b) un segundo agente que es un péptido que comprende al menos un epítipo que contiene una secuencia seleccionada entre PQELPY y QLQFPQELPYQPQS.

25 La presente invención también proporciona una composición que comprende un primer agente restringido a HLA-DQ2 y un segundo agente restringido a HLA-DQ8, en donde la composición comprende un péptido de la invención, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por una transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.

30 La presente invención también proporciona una composición que comprende un agente que contiene un epítipo de trigo y un agente que contiene un epítipo de centeno, en donde la composición comprende un péptido de la invención, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por una transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.

35 La presente invención también proporciona una composición que comprende un agente que contiene un epítipo de trigo y un agente que contiene un epítipo de cebada, en donde la composición comprende un péptido de la invención, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por una transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.

40 La presente invención también proporciona una composición que comprende un agente que contiene un epítipo de centeno y un agente que contiene un epítipo de cebada, en donde la composición comprende un péptido de la invención, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por una transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.

45 La presente invención también proporciona una composición que comprende un agente que contiene un epítipo de trigo, un agente que contiene un epítipo de cebada, y un agente que contiene un epítipo de centeno, en donde la composición comprende un péptido de la invención, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por una transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.

50 La presente invención proporciona adicionalmente un péptido de la invención, en donde el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, para su uso en la inducción de tolerancia de un individuo a una proteína gliadina para suprimir la producción de una respuesta de linfocitos T a dicho péptido.

55 La presente invención también proporciona un péptido de la invención, en donde el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad celíaca.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende: (a) un péptido de la invención, en donde el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP; (b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; y, opcionalmente, (c) un péptido que comprende al menos un epítipo que contiene una secuencia seleccionada entre PQPELPY y QLQFPQPPELPYPQPQS.

La presente invención proporciona un método para el diagnóstico de la enfermedad celíaca, o de susceptibilidad a la enfermedad celíaca, en un individuo que comprende:

- 10 (a) la puesta en contacto de una muestra procedente del hospedador con al menos un péptido de la invención, en donde el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, y opcionalmente, además, un péptido que comprende al menos un epítipo que contiene una secuencia seleccionada entre PQPELPY y QLQFPQPPELPYPQPQS;
- 15 (b) *la determinación in vitro* de si los linfocitos T de la muestra reconocen el péptido; donde el reconocimiento por los linfocitos T indica que el individuo tiene, o es susceptible a, la enfermedad celíaca.

La presente invención además proporciona el uso de un péptido de la invención, en donde el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, para la preparación de un medio diagnóstico para su uso en un método de diagnóstico de la enfermedad celíaca, o de susceptibilidad a la enfermedad celíaca, en un individuo, dicho método que comprende la determinación de si los linfocitos T del individuo reconocen el péptido, donde el reconocimiento por los linfocitos T indica que el individuo tiene, o es susceptible a, la enfermedad celíaca.

25 La invención además proporciona un método para la identificación de un análogo, análogo que es un péptido de la invención, en donde el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, unido a una molécula de HLA o a un fragmento de una molécula de HLA capaz de unirse al péptido, cuyo método comprende la determinación de si una sustancia candidata es reconocida por un receptor de los linfocitos T que reconoce un epítipo que comprende una secuencia que se puede obtener mediante desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, donde el reconocimiento de la sustancia indica que la sustancia es un análogo.

La invención también proporciona un método para la determinación de si una composición es capaz de provocar la enfermedad celíaca, que comprende la determinación de si hay presente en la composición una proteína que comprende una secuencia de oligopéptidos seleccionada entre FPQPQQPFP, QQPFPQPQQPFP y QQPFPQPQQPFP, donde la presencia de la proteína indica que la composición es capaz de provocar la enfermedad celíaca.

Aún más, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a una secuencia seleccionada entre FPQPQQPFP, QQPFPQPQQPFP y QPFPQPQQPFPWQP.

La invención también proporciona un kit para llevar a cabo:

- i. el método de diagnóstico de la invención en un individuo de la enfermedad celíaca, o de susceptibilidad a la enfermedad celíaca; o
- ii. el uso para la preparación de un medio diagnóstico de la invención;

donde el kit que comprende un péptido de la invención, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, y un medio para detectar el reconocimiento del péptido por los linfocitos T.

La invención también proporciona el uso de un péptido de la invención para producir un anticuerpo específico contra el péptido.

## Breve descripción de los dibujos

La invención está ilustrada por los dibujos acompañantes en los que:

La figura 1 muestra respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) recién aisladas (el eje vertical muestra puntos de formación de células por  $10^6$  PBMC) a un pool de péptidos, pool 3, tratados y no tratados con transglutaminasa (tTG) (cada péptido 10  $\mu$ g/ml) que incluye cinco 15-mer que se solapan y abarcan la A-gliadina 51-85 (véase Tabla 1) y una gliadina digerida con  $\alpha$ -quimotripsina (40  $\mu$ g/ml) en un Individuo 5 1 con enfermedad celíaca, inicialmente en remisión después de una dieta sin gluten y a continuación expuesto a 200 g de pan al día durante tres días desde el día 1 (a). Las respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  de PBMC por parte del Individuo 2 a pools de péptidos 1-10 de A-gliadina tratados con tTG que abarcan toda la proteína A-gliadina para una exposición a pan durante 10 días (b). El eje horizontal muestra los días después de comenzar la exposición al pan.

- 10 La figura 2 muestra las respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  de PBMC al pool de péptidos, pool 3, tratados con tTG (que abarcan la A-gliadina 51-85) en 7 individuos con enfermedad celíaca (el eje vertical muestra puntos de formación de células por  $10^6$  PBMC), inicialmente en remisión sometidos a una dieta sin gluten, expuestos a pan durante tres días (días 1 a 3). El eje horizontal muestra los días después del comienzo de la exposición al pan. (a). Respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  de PBMC a péptidos 15-mer que se solapan tratados con tTG incluidos en el pool 3; las barras 15 representan la respuesta media ( $\pm$  SEM) a péptidos individuales (10  $\mu$ g/ml) en 6 pacientes con enfermedad celíaca los días 6 o 7 (b). (En pacientes individuales, las respuestas ELISPOT a los péptidos se calcularon como % de respuesta provocada por el péptido 12 – como se muestra por el eje vertical).

- La figura 3 muestra respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  de PBMC a truncados de A-gliadina 56-75 (0,1  $\mu$ M) tratados 20 con tTG. Las barras representan la media ( $\pm$  SEM) en 5 individuos con enfermedad celíaca. (En individuos individuales, las respuestas se calcularon como % de respuesta máxima provocada por cualquiera de los péptidos sometidos a ensayo).

- La figura 4 muestra cómo se mapeo la estructura mínima del epítipo de A-gliadina dominante usando péptidos de A- 25 gliadina de 7-17-mer (0,1  $\mu$ M) tratados con tTG que incluyen la secuencia, PQPQLPY (SEQ ID NO: 4) (A-gliadina 62-68) (a), y los mismos péptidos sin el tratamiento con tTG pero con la sustitución Q $\rightarrow$ E65 (b). Cada línea representa las respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  de PBMC en cada uno de los tres individuos con enfermedad celíaca los días 6 o 7 después de haber ingerido pan los días 1-3. (En individuos individuales, las respuestas ELISPOT se calcularon como % de la respuesta provocada por el 17-mer de A-gliadina 57-73).

- 30 La figura 5 muestra los aminoácidos desamidados por la tTG. La secuencia LQLQFPQPQLPYPQPQSFP (SEQ ID NO: 5) (0,1  $\mu$ M) de A-gliadina 56-75 se incubó con tTG (50  $\mu$ g/ml) a 37 °C durante 2 horas. Se identificó un solo producto y se purificó por HPLC de fase inversa. El análisis de los aminoácidos permitió el cálculo del % de desamidación (Q $\rightarrow$ E) de cada resto de Gln en A-gliadina 56-75 que se puede atribuir a la tTG (eje vertical).

- 35 La figura 6 muestra el efecto de sustituir Q $\rightarrow$ E en A-gliadina 57-73 en otras posiciones además de Q65 usando los 17-mer: ELQFPQPQLPYPQPQS (SEQ ID NO: 6) (E57,65), QLQFPQPQLPYPQPES (SEQ ID NO: 7) (E65,72), ELQFPQPQLPYPQPES (SEQ ID NO: 8) (E57, 65, 72), y QLQFPQPQLPYPQPQS (SEQ ID NO: 2) (E65) en tres individuos con enfermedad celíaca los días 6 o 7 después de haber ingerido pan los días 1-3. El eje vertical muestra 40 el % de la respuesta E65.

- La figura 7 muestra que la A-gliadina 56-75 (0,1  $\mu$ M) tratada con tTG provoca respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  en (a) PBMC con cuentas magnéticas agotadas de CD4 y CD8. (Las barras representan las respuestas de PBMC agotadas de CD4 como % de respuestas de PBMC agotadas de CD8; los puntos de formación de células por millón 45 de PBMC agotadas de CD8 fueron: Individuo 4: 29, y Individuo 6: 535). (b) Respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  de PBMC (puntos de formación de células/millón de PBMC) después de la incubación con anticuerpos monoclonales para HLA-DR (L243), -DQ (L2) y -DP (B7.21) (10  $\mu$ g/ml) 1 h antes de la A-gliadina 56-75 (0,1  $\mu$ M) tratada con tTG en dos pacientes con enfermedad celíaca homocigóticos para HLA-DQ a1\*0501, b1\*0201.

- 50 La figura 8 muestra el efecto de sustituir la Glu en posición 65 por otros aminoácidos en el epítipo inmunodominante. El eje vertical muestra el % de respuesta en los 3 pacientes con respecto al epítipo inmunodominante.

- La figura 9 muestra la inmunorreactividad de péptidos de gliadina de origen natural (midiendo las respuestas de 3 55 individuos) que contienen la secuencia PQLPY (SEQ ID NO: 12) con (sombreado) y sin (claro) tratamiento con transglutaminasa.

La figura 10 muestra la depleción de cuentas inmunomagnéticas específicas para CD8, CD4,  $\beta$ 7, y  $\alpha$ E de células mononucleares de sangre periférica procedente de dos individuos celíacos, 6 días después de comenzar la

exposición a gluten seguido por ELISPOT para interferón gamma. Como antígenos se usaron la A-gliadina 57-73 QE65 (25 µg/ml), gliadina digerida con quimotripsina y tratada con tTG (100 µg/ml) o PPD (10 µg/ml).

La figura 11 muestra respuestas en diferentes grupos de pacientes.

5

La figura 12 muestra la bioactividad de homólogos de prolamina de la A-gliadina 57-73.

La figura 13 muestra, para individuos HLA-DQ2 sanos, el cambio en las respuestas ELISPOT para IFN-γ para pools de péptidos de A-gliadina desamidados con tTG.

10

La figura 14 muestra, para individuos HLA-DQ2 celíacos, el cambio en las respuestas ELISPOT para IFN-γ para pools de péptidos de A-gliadina desamidados con tTG.

La figura 15 muestra las contribuciones individuales de los péptidos a la respuesta "sumada" del péptido de gliadina.

15

La figura 16 muestra, para el individuo celíaco C08 HLA-DQ2/8, las respuestas ELISPOT para IFN-γ inducidas por exposición a gluten para pools de péptidos de A-gliadina desamidados con tTG.

La figura 17 muestra, para el individuo celíaco C07 HLA-DQ2/8, las respuestas ELISPOT para IFN-γ inducidas por exposición a gluten para pools de péptidos de A-gliadina desamidados con tTG.

20

La figura 18 muestra, para el individuo celíaco C12 HLA-DQ8/7, las respuestas ELISPOT para IFN-γ inducidas por exposición a gluten para pools de péptidos de A-gliadina desamidados con tTG.

25

La figura 19 muestra, para el individuo celíaco C11 HLA-DQ6/8, las respuestas ELISPOT para IFN-γ inducidas por exposición a gluten para pools de péptidos de A-gliadina desamidados con tTG.

#### **Descripción detallada de la invención**

30 El término "enfermedad celíaca" engloba un espectro de dolencias provocadas por grados variables de sensibilidad al gluten, que incluye una forma grave caracterizada por una mucosa plana del intestino delgado (atrofia vellosa hiperplásica) y otras formas caracterizadas por síntomas más leves.

El individuo mencionado anteriormente (en el contexto del diagnóstico o el tratamiento) es un ser humano. Puede padecer la enfermedad celíaca (sintomática o asintomática) o ser sospechoso de tenerla. Puede estar en una dieta sin gluten. Puede estar en una respuesta de fase aguda (por ejemplo, puede padecer la enfermedad celíaca, pero sólo ha ingerido gluten en las últimas 24 horas, antes de las cuales había estado en una dieta sin gluten durante 14 a 28 días).

35

40 El individuo puede ser susceptible a la enfermedad celíaca, tal como una susceptibilidad genética (determinada por ejemplo por que el individuo tiene parientes con enfermedad celíaca o posee genes que causan predisposición a la enfermedad celíaca).

#### **El agente**

45

El agente es un péptido de hasta 50 aminoácidos de longitud, tal como de 10 a 40, o de 15 a 30 aminoácidos de longitud.

La SEQ ID NO: 1 es PQPELPY. La SEQ ID NO: 2 es QLQPFQPELPYPQPQS. La SEQ ID NO: 3 se muestra en la Tabla 1 y es la secuencia de una A-gliadina completa. El glutamato en posición 4 de la SEQ ID NO: 1 (equivalente a la posición 9 de la SEQ ID NO: 2) es generado por tratamiento de la A-gliadina con transglutaminasa. La transglutaminasa está disponible en el mercado (por ejemplo Sigma T-5398).

50

Un análogo de un péptido de la invención puede ser reconocido por un TCR que reconoce el péptido de la invención. Por tanto, generalmente cuando se añade el análogo a linfocitos T en presencia del péptido de la invención, normalmente también en presencia de una célula presentadora de antígenos (APC) (tal como cualquiera de las APC mencionadas en este documento), el análogo inhibe el reconocimiento del péptido de la invención, es decir, el análogo es capaz de competir con el péptido de la invención en un sistema de este tipo.

55

El análogo puede ser uno capaz de unirse al TCR que reconoce el péptido de la invención. Dicha unión se puede someter a ensayo mediante técnicas convencionales. Dichos TCR se pueden aislar a partir de linfocitos T que hayan demostrado reconocer el péptido de la invención (por ejemplo, usando el método de la invención). A continuación se puede demostrar la unión del análogo de los TCR determinando si los TCR inhiben la unión del análogo a una sustancia que se une al análogo, por ejemplo, un anticuerpo al análogo. Normalmente, el análogo está unido a una molécula de MHC de clase II (por ejemplo, HLA-DQ2) en dicho ensayo de inhibición de la unión.

Normalmente el análogo inhibe la unión del péptido de la invención a un TCR. En este caso se reduce la cantidad del péptido de la invención que se puede unir al TCR en presencia del análogo. Esto es debido a que el análogo es capaz de unirse al TCR y por tanto compite con el péptido de la invención para la unión al TCR. Los linfocitos T para uso en los experimentos de unión anteriores se pueden aislar de pacientes con enfermedad celíaca, por ejemplo con la ayuda del método de la invención. Otras características de unión del análogo también pueden ser idénticas a las del péptido de la invención, y por lo tanto normalmente el análogo se une a la misma molécula del MHC de clase II a la que se une el péptido (HLA-DQ2 o -DQ8). El análogo normalmente se une a anticuerpos específicos para el péptido de la invención, y por lo tanto inhibe la unión del péptido de la invención a dichos anticuerpos.

El análogo normalmente es un péptido. Puede tener homología con el péptido de la invención, normalmente al menos el 70 % de homología, preferentemente al menos el 80, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % de homología con el péptido de la invención, por ejemplo, a lo largo de una región de al menos 15 o más aminoácidos contiguos (tal como la longitud completa del análogo y/o el péptido de la invención, o en toda la región que entra en contacto con el TCR o que se une a la molécula del MHC). Los métodos de medición de la homología de proteínas son muy conocidos en la técnica y los expertos en la materia comprenden que en el presente contexto, la homología se calcula en base a la identidad de aminoácidos (a veces denominada "homología dura").

Por ejemplo, el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que se puede usar para calcular la homología (por ejemplo, usado con sus ajustes por defecto) (Devereux y col., (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395). Se pueden usar los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular la homología o alinear secuencias (normalmente con sus ajustes por defecto), por ejemplo como se describe en Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36: 290-300; Altschul, S.F. y col., (1990) J Mol Biol 215: 403-10.

El *software* para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología en su web para todo el mundo a través de Internet en, por ejemplo, "www.ncbi.nlm.nih.gov/". Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda que coincidan o satisfagan alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T es el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul y col., supra). Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas y encontrar HSP que las contienen. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia mientras se pueda incrementar la puntuación de alineamiento acumulativa. Las extensiones para las coincidencias de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, alineamientos (B) de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89: 10915-10919) de 50, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual se produciría un emparejamiento al azar entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en la comparación de la primera secuencia a la segunda secuencia es menor a 1 aproximadamente, preferentemente inferior a 0,1 aproximadamente, más preferentemente inferior a 0,01 aproximadamente, y lo más preferentemente inferior a 0,001 aproximadamente.

Los análogos de péptidos homólogos difieren normalmente del péptido de la invención en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, delecciones o inserciones). Estas mutaciones se pueden medir a través de cualquiera de las regiones mencionadas anteriormente en relación con el cálculo de homología. Las sustituciones

preferentemente son 'conservativas'. Estas se definen de acuerdo con la Tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre sí:

|           |                 |         |
|-----------|-----------------|---------|
| ALIFÁTICO | No polar        | G A P   |
|           |                 | I L V   |
|           | Polar – cargado | C S T M |
|           |                 | N Q     |
|           | Polar – cargado | D E     |
|           |                 | K R     |
| AROMÁTICO |                 | H F W Y |

5

Normalmente los aminoácidos en el análogo en las posiciones equivalentes a los aminoácidos en el péptido de la invención que contribuyen a la unión a la molécula del MHC o que son responsables del reconocimiento por el TCR, son los mismos o están conservados.

10

Normalmente, el péptido análogo comprende una o más modificaciones, que pueden ser modificaciones post-traduccionales naturales o modificaciones artificiales. La modificación puede proporcionar un resto químico (normalmente por sustitución de un hidrógeno, por ejemplo, de un enlace C-H), tal como un grupo amino, acetilo, hidroxilo o halógeno (por ejemplo, flúor) o un grupo carbohidrato. Normalmente, la modificación está presente en el extremo N o C.

15

El análogo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, por ejemplo aminoácidos con una cadena lateral diferente de los aminoácidos naturales. Generalmente, el aminoácido no natural tendrá un extremo N y/o un extremo C. El aminoácido no natural puede ser un L o un D-aminoácido.

20

El análogo normalmente tiene una forma, un tamaño, una flexibilidad o una configuración electrónica que es sustancialmente similar al péptido de la invención. Normalmente es un derivado del péptido de la invención. En una realización, el análogo es una proteína de fusión que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 2, o cualquiera de los otros péptidos mencionados en este documento; y una secuencia distinta de la gliadina.

25

En una realización, el análogo es o simula el péptido de la invención unido a una molécula del MHC de clase II. Se pueden asociar o unir 2, 3, 4 o más de dichos complejos entre sí, por ejemplo usando un sistema basado en biotina/estreptavidina, en el que normalmente 2, 3 o 4 moléculas del MHC marcadas con biotina se unen a una fracción de estreptavidina. Este análogo normalmente inhibe la unión del complejo péptido de la invención/MHC de Clase II a un TCR o anticuerpo que es específico para el complejo.

30

El análogo normalmente es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo, tal como un fragmento Fab o (Fab)<sub>2</sub>. El análogo se puede inmovilizar sobre un soporte sólido, en particular un análogo que simula un péptido unido a una molécula del MHC.

35

El análogo normalmente se diseña por medios computacionales y a continuación se sintetiza usando métodos conocidos en la técnica. De manera alternativa, el análogo se puede seleccionar de una librería de compuestos. La librería puede ser una librería combinatoria o una librería de presentación, tal como una librería de presentación en fagos. La librería de compuestos se puede expresar en la librería de presentación unida a una molécula del MHC clase II, tales como HLA-DQ2 o -DQ8. Los análogos se seleccionan generalmente de la librería en función de su capacidad para simular las características de unión del péptido de la invención. Así, se pueden seleccionar en base a su capacidad para unirse a un TCR o un anticuerpo que reconoce el péptido de la invención.

40

Normalmente los análogos serán reconocidos por los linfocitos T al menos en la misma medida que cualquiera de los agentes del péptido de la invención, por ejemplo al menos en la misma medida que el epítipo equivalente y preferentemente en la misma medida que el péptido representado por la SEQ ID NO: 2, como se reconoce en

45



cualquiera de los ensayos descritos en este documento, normalmente usando linfocitos T de pacientes con enfermedad celíaca. Los análogos pueden ser reconocidos en estas medidas *in vivo* y así pueden ser capaces de inducir síntomas de la enfermedad celíaca al menos en la misma medida que cualquiera de los agentes mencionados en este documento (por ejemplo, en un paciente humano o un modelo animal).

5

Los análogos se pueden identificar en un método que comprende la determinación de si una sustancia candidata es reconocida por un receptor de linfocitos T que reconoce un epítipo de la invención, donde el reconocimiento de la sustancia indica que la sustancia es un análogo. Dichos TCR pueden ser cualquiera de los TCR mencionados en este documento, y pueden estar presentes en los linfocitos T. Se puede usar cualquier ensayo adecuado

10

mencionado en este documento para identificar el análogo. En una realización este método se lleva a cabo *in vivo*. Como se ha mencionado anteriormente los análogos preferidos son reconocidos al menos en la misma medida que el péptido SEQ ID NO: 2, y así el procedimiento se puede usar para identificar análogos que son reconocidos en esta medida.

15

En una realización, el método comprende la determinación de si una sustancia candidata es capaz de inhibir el reconocimiento de un epítipo de la invención, donde la inhibición del reconocimiento indica que la sustancia es un análogo.

20

El agente puede ser un producto que comprende al menos 2, 5, 10 o 20 péptidos de la invención. Normalmente, la composición comprende epítopos de diferentes gliadinas, tales como cualquiera de las especies o variedades o tipos de gliadinas mencionadas en este documento. Las composiciones comprenden al menos un epítipo de la invención. Las composiciones preferidas comprenden al menos un epítipo, o análogo equivalente, de todas las gliadinas presentes en cualquiera de las especies o variedades mencionadas en este documento, o de 2, 3, 4 o más de las especies mencionadas en este documento (tales como del plantel de especies constituido por el trigo, centeno, cebada, avena y tritical). Así, el agente puede ser monovalente o multivalente.

25

### Diagnóstico

30

La invención proporciona un método de diagnóstico como se define en este documento. Más en general, sin embargo, los métodos de diagnóstico que hacen uso de los péptidos de la invención pueden estar basados en la detección de linfocitos T que se unen al agente o en la detección de anticuerpos que reconocen el agente.

35

Los linfocitos T que reconocen el agente en el método (que incluye el uso mencionado anteriormente) generalmente son linfocitos T que han sido pre-sensibilizados a la gliadina *in vivo*. Como se ha mencionado anteriormente se ha comprobado que dichos linfocitos T expuestos al antígeno están presentes en la sangre periférica.

40

En el método, los linfocitos T pueden ponerse en contacto con el agente *in vitro* o *in vivo*, y la determinación de si los linfocitos T reconocen el agente se puede realizar *in vitro* o *in vivo*. Así, la invención proporciona el agente para su uso en un método de diagnóstico puesto en práctica sobre el cuerpo humano. Se proporcionan diferentes agentes para su uso simultáneo, separado o secuencial en dicho método.

45

El método *in vitro* normalmente se lleva a cabo en solución acuosa a la que se añade el agente. La solución también comprenderá los linfocitos T (y en determinadas realizaciones las APC descritas más adelante). El término "puesta en contacto" como se usa en este documento incluye la adición de la sustancia particular a la solución.

50

La determinación de si los linfocitos T reconocen el agente generalmente se realiza mediante la detección de un cambio en el estado de los linfocitos T en presencia del agente o la determinación de si los linfocitos T se unen al agente. El cambio de estado generalmente está provocado por actividad funcional antigénica específica del linfocito T después de que el TCR se una al agente. El cambio de estado se puede medir dentro (por ejemplo, cambio en la expresión intracelular de proteínas) o fuera (por ejemplo, detección de sustancias secretadas) de los linfocitos T.

55

El cambio de estado del linfocito T puede ser el comienzo o el aumento de la secreción de una sustancia del linfocito T, como una citoquina, especialmente IFN- $\gamma$ , IL-2 o TNF- $\alpha$ . En particular se prefiere la determinación de la secreción de IFN- $\gamma$ . La sustancia normalmente se puede detectar permitiendo que se una a un agente de unión específico y a continuación midiendo la presencia del complejo de agente de unión específico/sustancia. El agente de unión específico normalmente es un anticuerpo, tal como anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos para citoquinas están disponibles en el mercado, o se pueden preparar usando técnicas convencionales.

Normalmente, el agente de unión específico se inmoviliza sobre un soporte sólido. Después de dejar que la

sustancia se una al soporte sólido, opcionalmente se puede lavar para retirar el material que no se haya unido específicamente al agente. El complejo agente/sustancia se puede detectar usando un segundo agente de unión que se unirá al complejo. Normalmente, el segundo agente se une a la sustancia en un sitio que es diferente del sitio al que se une el primer agente. El segundo agente preferentemente es un anticuerpo y está marcado directa o indirectamente con un marcador detectable.

Así, el segundo agente se puede detectar mediante un tercer agente que normalmente está marcado directa o indirectamente con un marcador detectable. Por ejemplo, el segundo agente puede comprender un resto de biotina, permitiendo la detección por un tercer agente que comprende un resto de estreptavidina y normalmente fosfatasa alcalina como marcador detectable.

En una realización, el sistema de detección que se usa es el ensayo ELISPOT *ex vivo* descrito en el documento WO 98/23960. En ese ensayo, el IFN- $\gamma$  secretado desde el linfocito T es unido por un primer anticuerpo específico para IFN- $\gamma$  que está inmovilizado sobre un soporte sólido. A continuación se detecta el IFN- $\gamma$  unido usando un segundo anticuerpo específico para IFN- $\gamma$  que está marcado con un marcador detectable. Dicho anticuerpo marcado se puede obtener en Mabtech (Estocolmo, Suecia). Más abajo se describen otros marcadores detectables que se pueden usar.

El cambio de estado del linfocito T medible puede ser el aumento en la captación de sustancias por el linfocito T, tal como la captación de timidina. El cambio de estado puede ser un aumento en el tamaño de los linfocitos T, o la proliferación de los linfocitos T, o un cambio en los marcadores de la superficie celular en el linfocito T.

En una realización se detecta el cambio de estado midiendo el cambio en la expresión intracelular de proteínas, por ejemplo, el aumento en la expresión intracelular de cualquiera de las citoquinas mencionadas anteriormente. Dichos cambios intracelulares se pueden detectar poniendo en contacto el interior del linfocito T con un resto que se una a las proteínas expresadas de una manera específica y que permite la clasificación de los linfocitos T por citometría de flujo.

En una realización, cuando se une al TCR, el agente se une a una molécula del MHC de clase II (normalmente HLA-DQ2 o -DQ8), que normalmente está presente en la superficie de una célula presentadora de antígenos (APC). Sin embargo como se ha mencionado en el presente documento a un TCR se pueden unir otros agentes sin tener que unirse también a una molécula del MHC.

Generalmente los linfocitos T que se ponen en contacto en el método se obtienen del individuo en una muestra de sangre, aunque se pueden usar otros tipos de muestras que contengan linfocitos T. La muestra se puede añadir directamente al ensayo o primero se puede procesar. Normalmente, el procesamiento puede comprender la dilución de la muestra, por ejemplo con agua o tampón. Normalmente, la muestra se diluye de 1,5 a 100 veces, por ejemplo de 2 a 50 o de 5 a 10 veces.

El procesamiento puede comprender la separación de componentes de la muestra. Normalmente las células mononucleares (MC) se separan de las muestras. Las MC comprenderán los linfocitos T y las APC. Así, en el método las APC presentes en las MC separadas pueden presentar el péptido a los linfocitos T. En otra realización sólo los linfocitos T, tales como sólo los linfocitos T CD4, se pueden purificar a partir de la muestra. Las PBMC, las MC y los linfocitos T se pueden separar de la muestra usando técnicas conocidas en la materia, tales como las descritas en Lalvani y col., (1997) J. Exp. Med. 186, p859-865.

En una realización, los linfocitos T usados en el ensayo están en forma de muestras sin procesar o diluidas, o son linfocitos T recién aislados (tal como en forma de MC o PBMC recién aisladas) que se usan directamente *ex vivo*, es decir, no se cultivan antes de su uso en el método. Así, los linfocitos T no han sido reestimulados específicamente *in vitro* con un antígeno. Sin embargo, los linfocitos T se pueden cultivar antes de su uso, por ejemplo, en presencia de uno o más de los agentes, y en general también de citoquinas que promueven el crecimiento exógeno. Durante el cultivo, el agente(s) normalmente está presente en la superficie de las APC, tales como la APC usada en el método. El pre-cultivo de los linfocitos T puede dar lugar a un aumento en la sensibilidad del método. Así, los linfocitos T se pueden convertir en líneas celulares, tales como líneas celulares de corta duración (por ejemplo como se describe en Ota y col., (1990) Nature 346, p183-187).

La APC que normalmente está presente en el método puede proceder del mismo individuo que el linfocito T o de un hospedador diferente. La APC puede ser una APC de origen natural o una APC artificial. La APC es una célula que es capaz de presentar el péptido a un linfocito T. Normalmente es un linfocito B, una célula dendrítica o un

macrófago. Normalmente se separa de la misma muestra que el linfocito T y normalmente se purifica simultáneamente con el linfocito T. Así, la APC puede estar presente en MC o PBMC. La APC normalmente es una célula *ex vivo* recién aislada o una célula cultivada. Puede estar en forma de línea celular, tal como una línea celular de corta duración o una línea celular inmortalizada. La APC puede expresar en su superficie moléculas del MHC de clase II vacías.

En el método se pueden usar uno o más agentes (diferentes). Normalmente, los linfocitos T obtenidos de la muestra se pueden poner en un ensayo con todos los agentes que se pretende someter a ensayo o los linfocitos T se pueden dividir y se pueden poner en ensayos separados, cada uno de los cuales contiene uno o más de los agentes.

Los péptidos de la invención, tales como dos o más de los agentes mencionados en este documento (por ejemplo, las combinaciones de agentes que están presentes en el agente de la composición expuesto anteriormente), también se pueden aplicar a un uso simultáneo, por separado o secuencial (por ejemplo, a un uso *in vivo*).

En una realización, el propio agente se añade directamente a un ensayo que comprende linfocitos T y APC. Como se ha expuesto anteriormente, los linfocitos T y las APC en dicho ensayo pueden estar en forma de MC. Cuando se usan los agentes que pueden ser reconocidos por el linfocito T sin necesidad de presentación por las APC, entonces no son necesarias las APC. Los análogos que simulan el péptido original de la invención unido a una molécula del MHC son un ejemplo de dicho agente.

En una realización, el agente se suministra a la APC en ausencia del linfocito T. A continuación, la APC se suministra al linfocito T, normalmente después de que se les permita presentar el agente en su superficie. El péptido puede haber sido captado dentro de la APC y presentado, o simplemente haber sido captado sobre la superficie sin entrar en el interior de la APC.

El tiempo durante el cual el agente está en contacto con los linfocitos T variará dependiendo del método usado para determinar el reconocimiento del péptido. Normalmente se añaden de  $10^5$  a  $10^7$ , preferentemente de  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  PBMC a cada ensayo. En el caso en que se añade agente directamente al ensayo, su concentración es de  $10^{-1}$  a  $10^3$  µg/ml, preferentemente de 0,5 a 50 µg/ml o de 1 a 10 µg/ml.

Normalmente, el tiempo durante el cual se incuban los linfocitos T con el agente es de 4 a 24 horas, preferentemente de 6 a 16 horas. Cuando se usan PBMC *ex vivo* se ha comprobado que se pueden incubar  $0,3 \times 10^6$  PBMC en 10 µg/ml de péptido durante 12 horas a 37 °C.

La determinación del reconocimiento del agente por los linfocitos T se puede realizar midiendo la unión del agente a los linfocitos T (esto se puede llevar a cabo usando cualquier formato de ensayo de unión adecuado expuesto en este documento). Normalmente los linfocitos T que se unen al agente se pueden clasificar en base a esta unión, por ejemplo, usando un aparato de FACS. Se considerará que se produce la presencia de linfocitos T que reconocen el agente si la frecuencia de células clasificadas usando el agente está por encima de un valor de "control". La frecuencia de linfocitos T expuestos al antígeno generalmente es de 1 en  $10^6$  a 1 en  $10^3$ , y por lo tanto se puede determinar si las células clasificadas son linfocitos T expuestos al antígeno, o no.

La determinación del reconocimiento del agente por los linfocitos T se puede medir *in vivo*. Normalmente, el agente se administra al hospedador y a continuación se puede medir una respuesta que indica el reconocimiento del agente. El agente normalmente se administra por vía intradérmica o epidérmica. El agente normalmente se administra por contacto con el exterior de la piel, y se puede retener en el sitio con la ayuda de un emplastro o vendaje. De manera alternativa, el agente se puede administrar mediante una aguja, tal como por inyección, pero también se puede administrar por otros métodos tales como técnicas balísticas (por ejemplo, técnicas balísticas que se han usado para administrar ácidos nucleicos). El documento EP-A-0693119 describe técnicas que se pueden usar normalmente para administrar el agente. Normalmente se administra de 0,001 a 1000 µg, por ejemplo, de 0,01 a 100 µg o de 0,1 a 10 µg de agente.

En una realización, se puede administrar un producto que es capaz de proporcionar el agente *in vivo*. Así, se puede administrar un polinucleótido capaz de expresar el agente, normalmente en cualquiera de las formas descritas anteriormente para la administración del agente. El polinucleótido normalmente tiene cualquiera de las características del polinucleótido proporcionado por la invención que se describe a continuación. El agente se expresa a partir del polinucleótido *in vivo*. Normalmente se administra de 0,001 a 1000 µg, por ejemplo, de 0,01 a 100 µg o de 0,1 a 10 µg de polinucleótido.

El reconocimiento del agente administrado sobre la piel normalmente viene indicado por la aparición de inflamación (por ejemplo, induración, eritema o edema) en el sitio de administración. Generalmente esto se mide mediante la inspección visual del sitio.

- 5 El método de diagnóstico basado en la detección de un anticuerpo que se une al agente normalmente se lleva a cabo poniendo en contacto una muestra del individuo (tal como cualquiera de las muestras mencionadas en este documento, opcionalmente procesadas de cualquiera de las formas mencionadas en este documento) con el agente y determinando si un anticuerpo de la muestra se une al agente, donde dicha unión indica que el individuo tiene, o es susceptible a la enfermedad celíaca. Se puede usar cualquier formato adecuado de ensayo de unión, tal como  
10 cualquiera de los formatos mencionados en este documento.

### Terapia

- La identificación del epítipo inmunodominante y otros epítipos descritos en este documento permite la preparación  
15 de productos terapéuticos dirigidos a los linfocitos T que reconocen este epítipo (dichos linfocitos T que son los que participan en la respuesta inmunitaria contra la gliadina). Estos hallazgos también permiten la prevención o el tratamiento de la enfermedad celíaca por supresión (por inducción de tolerancia) de un anticuerpo o de una respuesta de los linfocitos T al epítipo(s).
- 20 Ciertos agentes de la invención se unen al TCR que reconoce el epítipo de la invención (medido usando cualquiera de los ensayos de unión descritos anteriormente) y provocan la inducción de tolerancia del linfocito T que porta el TCR. Dichos agentes, opcionalmente asociados a un vehículo, se pueden usar por tanto para prevenir o tratar la enfermedad celíaca.
- 25 Generalmente la inducción de tolerancia puede estar causada por los mismos péptidos que (después de ser reconocidos por el TCR) pueden generar actividad funcional antigénica específica del linfocito T (tal como cualquier actividad mencionada en este documento, por ejemplo secreción de citoquinas). Dichos agentes generan inducción de tolerancia cuando son presentados al sistema inmunitario en un contexto de 'inducción de tolerancia'.
- 30 La inducción de tolerancia da lugar a una disminución en el reconocimiento de un epítipo de linfocitos T o de un anticuerpo por el sistema inmunitario. En el caso de un epítipo de linfocitos T, ésta puede estar causada por la delección o anergia de los linfocitos T que reconocen el epítipo. Por lo tanto disminuye la actividad de los linfocitos T (por ejemplo como se mide en ensayos adecuados mencionados en este documento) en respuesta al epítipo. La inducción de tolerancia en la respuesta de un anticuerpo significa que, cuando se administra el epítipo, se produce  
35 una menor cantidad de anticuerpo específico para el epítipo.

- Los métodos de presentación de antígenos al sistema inmunitario en dicho contexto son conocidos y se describen por ejemplo en Yoshida y col. Clin. Immunol. Immunopathol. 82,207-215 (1997), Thureau y col. Clin. Exp. Immunol. 109, 370-6 (1997), y Weiner y col. Res. Immunol. 148, 528-33 (1997). En particular, ciertas vías de administración  
40 pueden provocar la inducción de tolerancia, tales como la vía oral, nasal o intraperitoneal. La inducción de tolerancia también se puede conseguir a través de las células dendríticas y de tetrámeros que presentan péptidos. Se pueden administrar al individuo productos particulares que generen la inducción de tolerancia (por ejemplo, en una composición que también comprende el agente). Dichos productos incluyen citoquinas, tales como citoquinas que favorecen una respuesta Th2 (por ejemplo, IL-4, TGF- $\beta$  o IL-10). Los productos o el agente se pueden administrar a  
45 una dosis que provoque la inducción de tolerancia.

- La invención proporciona una proteína que comprende una secuencia capaz de actuar como antagonista del linfocito T (linfocito T que reconoce el agente). Dichas proteínas y dichos antagonistas también se pueden usar para prevenir o tratar la enfermedad celíaca. El antagonista provocará una disminución en la respuesta de linfocitos T. En una  
50 realización, el antagonista se une al TCR del linfocito T (generalmente en forma de complejo con HLA-DQ2 o -DQ8), pero en vez de generar la activación funcional normal, provoca el paso de una señal anormal a través de la cascada de señalización intracelular del TCR, lo que hace que el linfocito T tenga disminuida la actividad funcional (por ejemplo, en respuesta al reconocimiento de un epítipo, normalmente medida por cualquier ensayo adecuado mencionado en este documento).

- 55 En una realización, el antagonista compite con el epítipo para unirse a un componente de la vía de procesamiento y presentación del MHC, tal como una molécula del MHC (normalmente HLA-DQ2 o -DQ8). Así, el antagonista se puede unir a HLA-DQ2 o -DQ8 (y por tanto ser un péptido presentado por esta molécula del MHC).

En la técnica se conocen métodos para provocar el antagonismo.

Puesto que la respuesta inmunitaria de los linfocitos T al epítipo de la invención en un individuo es policlonal, puede ser necesario administrar más de un antagonista para provocar el antagonismo de los linfocitos T de la respuesta que tienen diferentes TCR. Por lo tanto, los antagonistas se pueden administrar en una composición que comprenda al menos 2, 4, 6 o más antagonistas diferentes, cada uno que antagoniza linfocitos T diferentes.

En una realización, los antagonistas (incluyendo combinaciones de antagonistas para un epítipo particular) o los agentes de inducción de tolerancia (inducción de tolerancia a linfocitos T y anticuerpos) están presentes en una composición que comprende al menos 2, 4, 6 o más antagonistas o agentes que antagonizan o inducen tolerancia a diferentes epítopos de la invención, por ejemplo a las combinaciones de epítopos expuestas anteriormente en relación con los agentes que son un producto que comprende más de una sustancia.

*Ensayar si una composición es capaz de causar la enfermedad celíaca*

Como se ha mencionado anteriormente la invención proporciona un método para determinar si una composición es capaz de provocar la enfermedad celíaca, que comprende la detección de la presencia de una secuencia particular de proteínas (que puede ser modificada por una transglutaminasa; dicha actividad transglutaminasa puede ser una actividad transglutaminasa intestinal humana). Normalmente, esto se realiza mediante el uso de un ensayo de unión en el que un resto que se une a la secuencia de una manera específica se pone en contacto con la composición y se detecta la formación del complejo secuencia/resto y se usa para determinar la presencia del agente. Un resto de este tipo puede ser cualquier sustancia adecuada (o tipo de sustancia) mencionada en este documento, y normalmente es un anticuerpo específico. Se puede usar cualquier formato adecuado de ensayo de unión (tales como los mencionados en este documento).

En una realización, la composición se pone en contacto con al menos 2, 5, 10 o más anticuerpos que son específicos para los epítopos de diferentes gliadinas, por ejemplo, un plantel de anticuerpos capaces de reconocer las combinaciones de epítopos expuestas anteriormente en relación con agentes de la invención que son un producto que comprende más de una sustancia.

La composición normalmente comprende material de una planta que expresa una gliadina que es capaz de provocar la enfermedad celíaca (por ejemplo cualquiera de las gliadinas o plantas mencionadas en este documento). Dicho material puede ser una parte de la planta, tal como un producto recolectado (por ejemplo, la semilla). El material puede ser productos procesados del material vegetal (por ejemplo, cualquiera de los productos mencionados en este documento), tales como una harina o alimento que comprenda la gliadina. El procesamiento del material alimentario y la prueba en ensayos de unión adecuados es rutinario, por ejemplo, como se menciona en Kricka LJ, J. Biolumin. Chemilumin. 13, 189-93 (1998).

#### **Ensayos de unión**

La determinación de la unión entre dos sustancias mencionadas en el presente documento se puede realizar midiendo una característica de una o de las dos sustancias que cambie después de la unión, tal como un cambio espectroscópico.

El formato de ensayo de unión puede ser un sistema de "desplazamiento de banda". Esto implica determinar si la presencia de una sustancia (tal como una sustancia candidata) avanza o retrasa el progreso de la otra sustancia durante la electroforesis en gel.

El formato puede ser un método de unión competitiva que determina si la sustancia es capaz de inhibir la unión de la otra sustancia a un agente que se sabe que se une a la otra sustancia, como un anticuerpo específico.

#### *Kits*

La invención también proporciona un kit para llevar a cabo el método que comprende uno o más agentes y un medio para detectar el reconocimiento del agente por el linfocito T. Normalmente los diferentes agentes se proporcionan para un uso simultáneo, separado o secuencial. Por lo general los medios para detectar el reconocimiento permiten o ayudan a la detección basada en las técnicas descritas anteriormente.

Así, los medios pueden permitir la detección de una sustancia secretada por los linfocitos T después del

reconocimiento. El kit por tanto puede incluir adicionalmente un resto de unión específico para la sustancia, tal como un anticuerpo. El resto normalmente es específico para IFN- $\gamma$ . El resto normalmente está inmovilizado sobre un soporte sólido. Esto significa que después de la unión del resto, la sustancia permanecerá en las proximidades del linfocito T que lo haya secretado. Por lo tanto se forman "puntos" de complejo sustancia/resto sobre el soporte, cada punto que representa un linfocito T que está secretando la sustancia. La cuantificación de los puntos, y normalmente la comparación frente a un control, permite la determinación del reconocimiento del agente.

El kit también puede comprender un medio para detectar el complejo sustancia/resto. Se puede producir un cambio detectable en el propio resto después de la unión de la sustancia, tal como un cambio de color. De manera alternativa, se puede permitir la unión al complejo sustancia/resto de un segundo resto marcado directa o indirectamente para su detección para permitir la determinación de los puntos. Como se ha expuesto anteriormente el segundo resto puede ser específico para la sustancia, pero se une a un sitio diferente en la sustancia con respecto al primer resto.

El soporte inmovilizado puede ser una placa con pocillos, tal como una placa de microtitulación. Por tanto, cada ensayo se puede llevar a cabo en un pocillo aparte en la placa.

El kit adicionalmente puede comprender medio para los linfocitos T, restos de detección o tampones de lavado para su utilización en las etapas de detección. El kit adicionalmente puede comprender reactivos adecuados para la separación de la muestra, tales como la separación de PBMC o linfocitos T de la muestra. El kit puede estar diseñado para permitir la detección de los linfocitos T directamente en la muestra sin requerir ninguna separación de los componentes de la muestra.

El kit puede comprender un instrumento que permita la administración del agente, tal como administración por vía intradérmica o epidérmica. Normalmente dicho instrumento comprende un emplasto, un apósito o una o más agujas. El instrumento puede permitir la administración balística del agente. El agente en el kit puede estar en forma de composición farmacéutica.

El kit también puede comprender controles, tales como controles positivos o negativos. El control positivo puede permitir someter a ensayo el sistema de detección. Así, el control positivo normalmente simula el reconocimiento del agente en cualquiera de los métodos anteriores. Normalmente, en los kits diseñados para determinar el reconocimiento *in vitro* del control positivo es una citoquina. En el kit diseñado para detectar el reconocimiento *in vivo* del agente, el control positivo puede ser un antígeno al que la mayoría de individuos deberían presentar respuesta.

El kit también puede comprender un medio para tomar una muestra que contiene linfocitos T del hospedador, tal como una muestra de sangre. El kit puede comprender un medio para separar células mononucleares o linfocitos T de una muestra del hospedador.

#### 40 *Anticuerpos*

La invención también proporciona anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen específicamente los agentes (tales como cualquiera de los epítopos de la invención) y el uso de los agentes en los métodos de preparación de dichos anticuerpos. Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a estas sustancias de la invención.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fv, F(ab) y F(ab)<sub>2</sub>, así como anticuerpos de una sola cadena.

Un método para producir un anticuerpo policlonal comprende la inmunización de un animal hospedador adecuado, por ejemplo un animal experimental, con el inmunógeno y el aislamiento de las inmunoglobulinas a partir del suero. Por tanto, el animal se puede inocular con el inmunógeno, posteriormente se puede extraer sangre del animal y se puede purificar la fracción de IgG. Un método para producir un anticuerpo monoclonal comprende inmortalizar células que producen el anticuerpo deseado. Se pueden producir células de hibridoma por fusión de células de bazo de un animal experimental inoculado con células tumorales (Kohler y Milstein (1975) Nature 256, 495-497).

Se puede seleccionar una célula inmortalizada que produce el anticuerpo deseado mediante un procedimiento convencional. Los hibridomas se pueden hacer crecer en cultivo o se pueden inyectar por vía intraperitoneal para la formación de fluido de ascitis o en el torrente sanguíneo de un hospedador alogénico o un hospedador

inmunocomprometido. El anticuerpo humano se puede preparar mediante inmunización *in vitro* de linfocitos humanos, seguido por transformación de los linfocitos con el virus de Epstein-Barr.

Para la producción de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, el animal experimental de forma conveniente es una cabra, conejo, rata o ratón. Si se desea, el inmunógeno se puede administrar como un conjugado en el que el inmunógeno se acopla, por ejemplo a través de una cadena lateral de uno de los restos de aminoácidos, a un vehículo adecuado. La molécula vehículo normalmente es un vehículo fisiológicamente aceptable. El anticuerpo obtenido se puede aislar y, si se desea, se puede purificar.

- 10 El agente o anticuerpo de la invención pueden llevar un marcador detectable. Se prefieren los marcadores detectables que permiten la detección de la sustancia secretada mediante inspección visual, opcionalmente con la ayuda de un medio de magnificación óptica. Un sistema de ese tipo normalmente se basa en un marcador enzimático que provoca un cambio de color en un sustrato, por ejemplo, fosfatasa alcalina que provoca un cambio de color en un sustrato. Dichos sustratos están disponibles en el mercado, por ejemplo, en BioRad. Otros marcadores adecuados incluyen otras enzimas tales como peroxidasa, o marcadores de proteínas, como biotina; o radioisótopos, tales como <sup>32</sup>P o <sup>35</sup>S. Los marcadores anteriores se pueden detectar usando técnicas conocidas.

Los agentes o anticuerpos de la invención pueden estar en forma sustancialmente purificada. Pueden estar en forma sustancialmente aislada, en cuyo caso generalmente comprenderán al menos el 80 %, por ejemplo al menos el 90, 95, 97 o 99 % del polinucleótido, péptido, anticuerpo, células o masa seca en la preparación. El agente o anticuerpo normalmente está sustancialmente libre de otros componentes celulares. El agente o anticuerpo se pueden usar en una forma sustancialmente aislada, purificada o libre en el método o pueden estar presentes en dichas formas en el kit.

25 La invención proporciona agentes terapéuticos (incluyendo profilácticos) o sustancias diagnósticas (los agentes de la invención). Estas sustancias se formulan para su administración clínica mezclándolas con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se pueden formular para la administración por vía tópica, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, intradérmica, epidérmica o transdérmica. Las sustancias se pueden mezclar con cualquier vehículo que sea farmacéuticamente aceptable y apropiado para la vía de administración deseada. El vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para inyección pueden ser, por ejemplo, una solución estéril o isotónica tal como agua para inyección o solución salina fisiológica, o una partícula de soporte para la administración balística.

La dosis de las sustancias se puede ajustar según diversos parámetros, especialmente según el agente usado; la edad, el peso y las condiciones del paciente a tratar; el modo de administración usado; la gravedad de la afección a tratar; y el régimen clínico requerido. A modo de guía, la cantidad de sustancia administrada mediante inyección de forma conveniente es de 0,01 mg/kg a 30 mg/kg, preferentemente de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg.

Las vías de administración y dosificaciones descritas pretenden ser sólo una guía, ya que el facultativo experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración y la dosificación óptimas para cualquier paciente y afección particular.

El agente de la invención se puede preparar usando técnicas de química sintética convencional, tales como mediante el uso de un sintetizador automático. El agente se puede preparar a partir de un polipéptido más largo, por ejemplo, una proteína de fusión, polipéptido que normalmente comprende la secuencia del péptido. El péptido se puede obtener a partir del polipéptido mediante, por ejemplo, hidrolización del polipéptido, tal como el uso de una proteasa; o la rotura física del polipéptido. El polinucleótido de la invención se puede preparar usando técnicas convencionales, tales como mediante el uso de un sintetizador.

50 La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

#### Ejemplo 1

Se llevó a cabo el mapeo de epítomos en la enfermedad celíaca mediante el uso de un grupo de 51 péptidos 15-mer sintéticos que abarcan la secuencia completa de una a-gliadina completamente caracterizada, "A-gliadina" (véase Tabla 1). Los péptidos de la A-gliadina también se trataron individualmente con tTG para generar productos que puedan simular a los producidos *in vivo*<sup>3</sup>. También tratamos de estudiar a pacientes con enfermedad celíaca en el punto de iniciación de la recidiva de la enfermedad para evitar la posibilidad de que se pudiera haber producido la "difusión" o "depleción" del epítomo, como se describe en las enfermedades infecciosas y autoinmunes

experimentales.

*Respuestas de linfocitos T clínicas y específicas de la A-gliadina con exposición a pan durante 3 y 10 días*

- 5 En un estudio piloto, a dos individuos con enfermedad celíaca en remisión, definida por la ausencia de anticuerpos anti-endomisio (EMA) séricos, en una dieta sin gluten se les administró diariamente cuatro rebanadas de pan blanco convencional que contiene gluten además de su dieta sin gluten habitual. El Individuo 1 detuvo la ingesta de pan debido a dolor abdominal, úlceras bucales y diarrea leve después de tres días, pero el Individuo 2 continuó durante 10 días solo con náuseas leves a la semana. El EMA fue positivo en el Individuo 2 una semana después de la exposición a pan, lo que indica que el pan usado había causado una recaída de la enfermedad celíaca. Pero en el Individuo 1, el EMA siguió siendo negativo hasta dos meses después de la exposición a pan. En ambos individuos, los síntomas que aparecen con la exposición a pan se resolvieron en dos días, después de regresar a la dieta sin gluten.
- 15 No se encontraron respuestas de PBMC en ensayos ELISPOT para IFN- $\gamma$  a péptidos de A-gliadina antes o durante la exposición a pan. Pero desde el día después de la retirada del pan (Día 4) en el Individuo 1 un solo pool de 5 péptidos superpuestos que abarcan la A-gliadina 51-85 (Grupo 3) tratada con tTG mostró respuestas de IFN- $\gamma$  potentes (véase Figura 1a). En el Individuo 1, la respuesta de IFN- $\gamma$  de PBMC al péptido de A-gliadina se mantuvo específica solo para el pool 3 y fue máxima el día 8. La dinámica y la magnitud de la respuesta al pool 3 fueron similares a las provocadas por la gliadina digerida con  $\alpha$ -quimotripsina. Las respuestas de IFN- $\gamma$  de PBMC al pool 3 tratado con tTG fueron siempre de 5 a 12 veces superiores que el pool 3 no tratado con tTG, y las respuestas a la gliadina digerida con  $\alpha$ -quimotripsina fueron de 3 a 10 veces superiores si se trata con tTG. En el Individuo 2, el pool 3 tratado con tTG también fue el único grupo de péptidos de A-gliadina el día 8, pero esta respuesta fue más débil que en el Individuo 1, no se observó el día 4 y para el día 11 la respuesta al pool 3 había disminuido y otros pools 25 tratados con tTG de péptidos de A-gliadina desencadenaron respuestas de IFN- $\alpha$  más potentes (véase Figura 1b).

El estudio piloto indicó que la respuesta inicial de los linfocitos T en estos individuos con enfermedad celíaca era contra un único pool de cinco péptidos de A-gliadina tratada con tTG y se midió fácilmente en sangre periférica. Pero si se proseguía con la exposición al antígeno durante diez días en lugar de tres días, aparecen respuestas de linfocitos T a otros péptidos de A-gliadina, consistentes con la difusión de epítipo.

*Inducción de IFN- $\gamma$  específica de la enfermedad celíaca mediante péptidos de A-gliadina tratados con tTG*

- En cinco de los seis nuevos individuos con enfermedad celíaca en dieta sin gluten (véase Tabla 1), la exposición a pan durante tres días identificó los péptidos tratados con tTG en el pool 3, y en particular, péptidos que corresponden a 56-70 (12) y 60-75 (13) como únicos componentes de A-gliadina que provocan la liberación de IFN- $\gamma$  de las PBMC (véase Figura 2). Ensayos de ELISPOT para IL-10 realizados en paralelo a ELISPOT para IFN- $\gamma$  no mostraron respuesta de IL-10 a los péptidos 12 o 13 tratados con tTG. En un individuo, no hubo respuestas de IFN- $\gamma$  a ningún péptido de A-gliadina o de gliadina digerida con  $\alpha$ -quimotripsina antes, durante o hasta cuatro días después de la exposición a pan. En ninguno de estos individuos con enfermedad celíaca varió el estado de EMA con respecto al estado basal cuando se mide durante hasta dos meses después de la exposición a pan.

- Las PBMC de cuatro individuos sanos EMA negativos con los alelos de HLA-DQ  $\alpha$ 1\*0501,  $\beta$ 1\*0201 (edades 28-52, 2 mujeres), que habían sido estimulados durante tres días con pan después de seguir una dieta sin gluten durante un mes no mostraron respuestas de IFN- $\gamma$  por encima del control negativo a ninguno de los péptidos de A-gliadina con o sin tratamiento con tTG. Por lo tanto, la inducción de IFN- $\gamma$  en PBMC al pool 3 tratado con tTG y a los péptidos de A-gliadina 56-70 (12) y 60-75 (13) era específica de la enfermedad celíaca (7/8 frente a 0/4,  $p < 0,01$  por análisis Chi cuadrado).

*Mapeo fino del epítipo mínimo de linfocitos T para A-gliadina*

- Los péptidos tratados con tTG que representan truncamientos de A-gliadina 56-75 revelaron que era esencial la misma secuencia peptídica central QPQLP (SEQ ID NO: 9) para la antigenicidad en los cinco individuos evaluados con enfermedad celíaca (véase Figura 3). Las respuestas de IFN- $\gamma$  de PBMC a péptidos tratados con tTG que abarcan esta secuencia central que comienza por el 7-mer PQQQLPY (SEQ ID NO: 4) y que aumenta de longitud, indicaban que el 17-mer QLQFPQPQLPYQPQS (SEQ ID NO: 10) (A-gliadina 57-73) tratado con tTG poseía una actividad óptima en el ELISPOT para IFN- $\gamma$  (véase Figura 4).



*La desamidación de Q65 por tTG genera el epítipo inmunodominante de linfocitos T en A-gliadina*

El análisis por HPLC demostró que el tratamiento con tTG de A-gliadina 56-75 genera un solo producto que eluyó ligeramente más tarde que el péptido parental. La secuenciación de aminoácidos indicaba que de los seis restos de glutamina (Q) contenidos en A-gliadina 56-75, preferentemente Q65 era desamidado por tTG (véase Figura 5). La bioactividad de los péptidos correspondientes a las expansiones en serie desde la secuencia central A-gliadina 62-68 en la que el glutamato (E) sustituye a Q65, era equivalente a los mismos péptidos con Q65 después del tratamiento con tTG (véase Figura 4a). La sustitución de Q57 y Q72 por E, juntos o por separado, con E65 no mejoró la antigenicidad del 17-mer en los tres individuos estudiados con enfermedad celíaca (véase Figura 6). Se investigó Q57 y Q72 debido a que los restos de glutamina seguidos de prolina en los péptidos de gliadina no son desamidados *in vitro* por tTG (W. Vader y col., Proceedings 8th International Symposium Coeliac Disease). Por lo tanto, el epítipo inmunodominante de linfocitos T se definió como QLQPFQPELPYPQPQS (SEQ ID NO: 2).

*La respuesta al epítipo inmunodominante de linfocitos T está restringida a DQ2 y depende de CD4*

En dos individuos con enfermedad celíaca homocigóticos para HLA-DQ  $\alpha 1^*0501$ ,  $\beta 1^*0201$ , el anticuerpo monoclonal anti-DQ bloquea la respuesta de IFN- $\gamma$  en ELISPOT a A-gliadina 56-75 tratada con tTG, pero el anticuerpo anti-DP y anti-DR no (véase Figura 7). La depleción de cuentas magnéticas anti-CD4 y anti-CD8 de PBMC de dos individuos con enfermedad celíaca indican que la respuesta de IFN- $\gamma$  a A-gliadina 56-75 tratada con tTG está mediada por linfocitos CD4.

*Discusión*

En este estudio describimos una exposición a antígenos de la dieta bastante simple usando pan blanco convencional para provocar una población transitoria de linfocitos T CD4 en sangre periférica de individuos con enfermedad celíaca sensibles a un 17-mer de A-gliadina tratada con tTG con la secuencia: QLQPFQPELPYPQPQS (SEC ID NO: 2) (restos 57-73). La respuesta inmunitaria a A-gliadina 56-75 (Q  $\rightarrow$  E65) está restringida al alelo del HLA asociado a la enfermedad celíaca, DQ  $\alpha 1^*0501$ ,  $\beta 1^*0201$ . La acción de la transglutaminasa tisular *in vitro* desamida selectivamente Q65. Las respuestas de IFN- $\gamma$  de sangre periférica provocadas por los péptidos sintéticos de A-gliadina con la sustitución Q  $\rightarrow$  E65 es equivalente a los péptidos de A-gliadina Q65 tratados con tTG; ambas estimulan hasta 10 veces más linfocitos T en ELISPOT para IFN- $\gamma$  que los péptidos de A-gliadina Q65 sin modificar.

Hemos definido deliberadamente este epítipo de linfocitos T específico de la enfermedad celíaca usando la exposición de antígenos *in vivo* y ensayos inmunitarios *ex vivo* de corta duración para evitar la posibilidad de artefactos metodológicos que se pudieran producir con el uso de clones de linfocitos T en el mapeo del epítipo. Nuestros hallazgos indican que las respuestas de linfocitos T de sangre periférica a la ingestión de gluten son rápidas pero de corta duración y que se pueden utilizar para el mapeo de epítipos. La estimulación con antígenos *in vivo* también demuestra que existe una jerarquía temporal en las respuestas inmunitarias a los péptidos de A-gliadina; la A-gliadina 57-73 modificada por tTG no sólo desencadena la respuesta de IFN- $\gamma$  más potente en PBMC sino que también es la primera respuesta de IFN- $\gamma$  en aparecer.

Debido a que únicamente evaluamos péptidos que abarcan la A-gliadina, puede haber otros epítipos en otras gliadinas de la misma o de mayor importancia en la patogénesis de la enfermedad celíaca. De hecho, la secuencia peptídica en el núcleo del epítipo en A-gliadina que hemos identificado, PQPQLPY (SEQ ID NO: 4), es compartida por diversas otras gliadinas (números de acceso de SwissProt y Trémbl: P02863, Q41528, Q41531, Q41533, Q9ZP09, P04722, P04724, P18573). Sin embargo, los péptidos de A-gliadina que se ha demostrado previamente que poseen actividad biológica en estudios de estimulación de biopsia y estudios *in vivo* (por ejemplo: 31-43, 44-55 y 206-217)<sup>4,5</sup> no provocaron respuestas de IFN $\gamma$  en PBMC después de tres días de exposición a pan en individuos con enfermedad celíaca. Estos péptidos pueden ser epítipos de linfocitos T "secundarios" que surgen con la propagación de la respuesta inmunitaria.

**Ejemplo 2**

*Efecto de las sustituciones en el epítipo inmunodominante sobre el reconocimiento de los linfocitos T*

Se determinó el efecto de sustituir el glutamato en posición 65 en el epítipo de A-gliadina 57-73 midiendo las respuestas en sangre periférica frente a epítipos sustituidos en un ensayo ELISPOT para IFN- $\gamma$  usando péptidos

sintéticos (a 50 µg/ml). Las respuestas se midieron en 3 individuos con enfermedad celíaca 6 días después de comenzar la exposición a gluten (4 rebanadas de pan al día durante 3 días). Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 8. Como se puede observar la sustitución del glutamato por histidina, tirosina, triptófano, lisina, prolina o arginina estimuló una respuesta cuya magnitud era inferior al 10 % de la magnitud de la respuesta al epítipo inmunodominante. Así, se podría usar la mutación de A-gliadina en esta posición para producir un A-gliadina mutante con una inmunorreactividad reducida o nula.

### Ejemplo 3

#### 10 Ensayo de la inmunorreactividad de péptidos equivalentes procedentes de otras gliadinas de origen natural

Se evaluó la inmunorreactividad de péptidos equivalentes procedentes de otras gliadinas de trigo de origen natural usando péptidos sintéticos correspondientes a las secuencias de origen natural que a continuación se trataron con transglutaminasa. Estos péptidos se sometieron a ensayo en un ELISPOT de la misma manera y con PBMC obtenidas de los mismos individuos que se ha descrito en el Ejemplo 2. Al menos cinco de los péptidos muestran una inmunorreactividad comparable al péptido E65 de la A-gliadina 57-73 (después del tratamiento con la transglutaminasa), lo que indica que también es probable que otras proteínas de A-gliadina en el trigo induzcan esta respuesta inmunitaria específica de la enfermedad celíaca (Tabla 4 y Figura 9).

#### 20 Métodos

*Individuos:* Los pacientes usados en el estudio asistieron a una clínica celíaca en Oxford, Reino Unido. La enfermedad celíaca se diagnostica sobre la base de la histología típica del intestino delgado, y la normalización de los síntomas y la histología del intestino delgado con una dieta sin gluten.

*Tipado tisular:* El tipado tisular se llevó a cabo usando ADN extraído de sangre periférica anticoagulada con EDTA. La genotipificación de HLA-DQA y DQB se llevó a cabo mediante PCR usando mezclas de cebadores específicas de secuencia<sup>6-8</sup>.

*Ensayo de anticuerpos anti-endomisio:* Los EMA se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta usando suero de paciente diluido a 1:5 con esófago de mono, seguido de IgA de cabra dirigida contra humano conjugada con FITC. La IgA se cuantificó antes del EMA, ninguno de los individuos eran deficiente en IgA.

*Exposición al antígeno:* Los individuos con enfermedad celíaca que siguen una dieta sin gluten, consumieron 4 rebanadas de pan con gluten (50 g/rebanada, "pan de molde blanco convencional" de Sainsbury) al día durante 3 o 10 días. El EMA se evaluó la semana antes y hasta dos meses después de comenzar la exposición a pan. Los individuos sanos que habían seguido una dieta sin gluten durante cuatro semanas, consumieron su dieta habitual, incluyendo cuatro rebanadas de pan con gluten durante tres días, y después volvieron a la dieta sin gluten durante seis días más.

*ELISPOT para IFN-γ e IL-10:* Se prepararon PBMC a partir de 50-100 ml de sangre venosa mediante centrifugación de densidad en Ficoll-Hypaque. Después de tres lavados, las PBMC se resuspendieron en RPMI completo que contiene el 10 % de suero AB humano inactivado por calor. Los ensayos ELISPOT para la secreción de células individuales de IFN-γ e IL-10 se llevaron a cabo utilizando kits comerciales (Mabtech; Estocolmo, Suecia) con placas de 96 pocillos (MAIP-S-45, Millipore, Bedford, MA) según las instrucciones del fabricante (como se describe en otra parte<sup>9</sup>) con  $2.5 \times 10^5$  (IFN-γ) o  $0.4-1 \times 10^5$  (IL-10) PBMC en cada pocillo. Los péptidos se evaluaron en pocillos duplicados, y se incluyó un derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD RT49) (Serum Institute; Copenhagen, Dinamarca) (20 µg/ml) como control positivo en todos los ensayos.

*Péptidos:* Los péptidos sintéticos se adquirieron de Research Genetics (Huntsville, Alabama). La espectroscopía de masas y la HPLC verificaron la autenticidad de los péptidos y una pureza > 70 %. La digestión de gliadina (Sigma; G-3375) (100 mg/ml) con α-quimotripsina (Sigma; C-3142) 200:1 (p/p) se realizó a temperatura ambiente en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M con urea 2 M y se detuvo después de 24 h por calentamiento a 98 °C durante 10 minutos. Después de la centrifugación (13.000 g, 10 minutos), el sobrenadante de la digestión de gliadina se esterilizó por filtración (0,2 µm). La digestión de la gliadina se verificó por SDS-PAGE y se evaluó la concentración de proteínas. La gliadina digerida con α-quimotripsina (640 µg/ml) y los péptidos sintéticos de gliadina (15-mer: 160 µg/ml, otros péptidos: 0,1 mM) se trataron individualmente con tTG (Sigma; T-5398) (50 µg/ml) en PBS +  $\text{CaCl}_2$  1 mM durante 2 horas a 37 °C. Los péptidos y los pools de péptidos se dividieron en alícuotas en placas estériles de 96 pocillos y se almacenaron congelados a -20 °C hasta su uso.

*Secuenciación de aminoácidos de los péptidos:* Se usó HPLC de fase inversa para purificar el péptido resultante del tratamiento con tTG de A-gliadina 56-75. Se identificó un único producto y se sometió a secuenciación de aminoácidos (secuenciador automatizado Modelo 494A, Applied Biosystems, Foster City, California). La secuencia de G56-75 sin modificar se confirmó como: LQLQFPQPQLPYQPQSFP (SEQ ID NO: 5), y la secuencia de G56-75 tratada con tTG se identificó como: LQLQFPQPELPYPQPQSFP (SEQ ID NO: 11). La desamidación de restos de glutamilo se definió como la cantidad (pmol) de glutamato recuperado expresada como porcentaje de la cantidad combinada de glutamina y glutamato recuperada en los ciclos 2, 4, 8, 10, 15 y 17 de la secuenciación de aminoácidos. La desamidación atribuible a la tTG se definió como (% de desamidación de glutamina en el péptido tratado con tTG - % de desamidación en el péptido sin tratar)/(100 - % de desamidación en el péptido sin tratar).

*Restricción de CD4/CD8 y HLA de Clase II:* Cuentas magnéticas recubiertas con anti-CD4 o anti-CD8 (Dynal, Oslo, Noruega) se lavaron cuatro veces con RPMI y a continuación se incubaron con PBMC en RPMI completo que contiene el 10 % de suero AB humano inactivado por calor ( $5 \times 10^6$  células/ml) durante 30 minutos en hielo. Las cuentas se retiraron usando un imán y las células restantes se sometieron a recuento. Se estableció la restricción *in vivo* del HLA de clase II de la respuesta inmunitaria a la A-gliadina 56-75 tratada con tTG incubando PBMC ( $5 \times 10^6$  células/ml) con anticuerpos monoclonales dirigidos contra HLA-DR (L243), -DQ (L2), y -DP (B7.21) (10 µg/ml) a temperatura ambiente durante una hora antes de la adición del péptido.

## 20 Ejemplo 12

*Desarrollo de ELISPOT para interferón gamma usando PBMC y A-gliadina 57-73 QE65 y P04724 84-100 QE92 como diagnóstico para la enfermedad celíaca: Definición de la capacidad de respuesta inmunitaria en enfermedad celíaca recién diagnosticada*

La inducción de la capacidad de respuesta al epítipo dominante en A-gliadina de los linfocitos T en PBMC medida en el ELISPOT para interferón gamma se produce después de la exposición a gluten en casi todos los individuos DQ2+ celíacos que siguen una dieta estricta sin gluten (DSG) de larga duración pero no en individuos DQ2+ sanos después de 4 semanas tras una DSG estricta. Las respuestas a A-gliadina 57-73 QE65 no son medibles en PBMC de individuos celíacos antes de la exposición a gluten y los datos piloto sugieren que estas respuestas no se podrían medir en PBMC de celíacos sin tratar. Estos datos sugieren que en la enfermedad celíaca, se recupera la capacidad de respuesta inmunitaria a A-gliadina 57-73 QE65 después de la exclusión del antígeno (DSG). Si se ha de desarrollar un ensayo diagnóstico usando el ensayo ELISPOT y PBMC, es deseable definir la duración de la DSG necesaria antes de que la exposición a gluten sea capaz de inducir respuestas a la A-gliadina 57-73 QE65 y otros péptidos de gliadina inmunorreactivos en sangre.

Individuos DQ2+ celíacos recién diagnosticados fueron reclutados en el servicio de consultas externas de gastroenterología. Se prepararon PBMC y se sometieron a ensayos de ELISPOT para interferón gamma antes de que los individuos comenzasen la DSG, y durante una o dos semanas después de comenzar la DSG. Además, se llevó a cabo la exposición a gluten (3 días consumiendo 4 rebanadas de pan blanco convencional, 200 g/día) durante una o dos semanas después de comenzar la DSG. Se prepararon PBMC y se sometieron a ensayo el día seis después de comenzar la exposición a gluten. Se evaluaron la A-gliadina 57-73 QE65 (A), P04724 84-100 QE92 (B) (solo y combinado) y la A-gliadina 57-73 QP65 (P65) (variante no bioactiva, véase más arriba) (todos a 25 µg/ml).

Todos eran DQ2+, menos un paciente celíaco recién diagnosticado (uno era DQ8+) ( $n = 11$ ). Las PBMC de celíacos recién diagnosticados que no habían sido tratados, o después de 1 o 2 semanas después de la DSG no mostraron respuestas a A-gliadina 57-73 QE65 y P04724 84-100 QE92 (sola o combinada) que no fueran significativamente diferentes del blanco o de la A-gliadina 57-73 QP65 ( $n = 9$ ) (véase Figura 11). La exposición a gluten en celíacos que habían seguido la DSG sólo durante una semana no mejoró sustancialmente las respuestas a A-gliadina 57-73 QE65 o P04724 84-100 QE92 (sola o combinada). Pero la exposición a gluten 2 semanas después de comenzar la DSG indujo respuestas a A-gliadina 57-73 QE65 y P04724 84-100 QE92 (sola o combinada) que fueron significativamente superiores que la variante de A-gliadina 57-73 QP65 no bioactiva y el blanco. Aunque estas respuestas después de la exposición a gluten a las 2 semanas son significativas, parecen ser inferiores que en los individuos >2 meses después de comenzar la DSG. Las respuestas a A-gliadina 57-73 QE65 sola eran equivalentes o superiores a las respuestas a P04724 84-100 QE92 sola o cuando se mezcla con A-gliadina 57-73 QE65. Ninguno de los individuos experimentó síntomas preocupantes con la exposición a gluten.

La capacidad de respuesta inmunitaria (como se mide en PBMC después de la exposición a gluten) a A-gliadina se

recupera parcialmente 2 semanas después de comenzar la DSG, lo que implica que "la falta de capacidad de respuesta inmunitaria" a este epítipo dominante de linfocitos T prevalece en la enfermedad celíaca sin tratar y durante al menos una semana después de comenzar la DSG. El momento óptimo de un ensayo diagnóstico para la enfermedad celíaca mediante la exposición a gluten y la medición de las respuestas a A-gliadina 57-73 QE65 en el ensayo ELISPOT es al menos 2 semanas más tarde de comenzar una DSG.

Los linfocitos T que secretan interferón gamma específicos para la A-gliadina 57-73 QE65 no se pueden medir en la sangre periférica de celíacos no tratados, y sólo pueden ser inducidos por la exposición a gluten después de al menos 2 semanas de DSG (exclusión del antígeno). Por lo tanto, el momento del ensayo diagnóstico usando esta metodología es crucial y son necesarios más estudios para su optimización. Estos hallazgos son consistentes con la anergia funcional de los linfocitos T específicos para el epítipo dominante, A-gliadina 57-73 QE65, revertida por la exclusión del antígeno (DSG). Este fenómeno no se ha demostrado con anterioridad en una enfermedad humana, y apoya la posibilidad de que la anergia de linfocitos T pueda ser inducible con terapia peptídica en enfermedad celíaca.

### Ejemplo 13

#### *Mapeo integral de epítopos de linfocitos T para gliadina de trigo*

La estimulación con el antígeno induce linfocitos T específicos para el antígeno en la sangre periférica. En la enfermedad celíaca, el gluten es el antígeno que mantiene esta enfermedad mediada por el sistema inmunitario. La exposición a gluten en la enfermedad celíaca tratada con una dieta sin gluten conduce a la aparición de linfocitos T específicos para el gluten en sangre periférica, de modo que permite la determinación de la especificidad molecular de epítopos de linfocitos T para el gluten. Como se ha descrito anteriormente, hemos identificado un único epítipo dominante de linfocitos T en un modelo de proteína de gluten, A-gliadina (57-73 desamidada en Q65). En este Ejemplo, se usó la exposición a gluten en pacientes celíacos para probar todas las posibles secuencias de 12 aminoácidos en cada proteína de gliadina de trigo conocida obtenida de 111 entradas en GenBank. En total, se probaron 652 péptidos 20-mer en enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ2 y HLA-DQ8. Siete de los 9 individuos celíacos con el complejo HLA-DQ2 clásico (HLA-DQA1\*05, HLA-DQB1\*02) presente en más del 90 % de los celíacos tenían una respuesta en sangre periférica de linfocitos T inducible para A-gliadina 57-73 QE65 y específica para gliadina. La A-gliadina 57-73 era el único epítipo de linfocitos T para  $\alpha$ -gliadina significativo, y el epítipo de linfocitos T para gliadina más potente, en enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ2. Además, había hasta 5 familias de péptidos estructuralmente relacionados que eran entre un 10 y un 70 % tan potentes como la A-gliadina 57-73 en el ensayo ELISPOT para interferón- $\gamma$ . Estos nuevos epítopos de linfocitos T se obtuvieron a partir de  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas e incluyen secuencias comunes que eran estructuralmente muy similares, pero no idénticas, a la secuencia central de la A-gliadina 57-73 (secuencia central: FPQPQLPYP (SEQ ID NO: 18)), por ejemplo: FPQPQQPFP (SEQ ID NO: 19) y PQQPQQPFP (SEQ ID NO: 20). Aunque no se han encontrado homólogos de la A-gliadina 57-73 en el centeno o la cebada, los otros dos cereales tóxicos en la enfermedad celíaca, los epítopos de linfocitos T recién definidos en  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas tienen emparejamientos exactos en las proteínas de almacenamiento del centeno y la cebada (secalinas y hordeínas, respectivamente).

La enfermedad celíaca no asociada al HLA-DQ2 casi siempre está asociada al HLA-DQ8. Ninguno de los siete individuos celíacos HLA-DQ8+ presentaba respuestas inducibles de linfocitos T específicas a A-gliadina 57-73 después de la exposición a gluten, a menos que también poseyesen el complejo completo HLA-DQ2. Dos de 4 individuos celíacos HLA-DQ8+ que no poseían el complejo completo HLA-DQ2, presentaron respuestas inducibles de linfocitos T específicas para el péptido de gliadina. En un individuo HLA-DQ8, se identificó un nuevo epítipo de linfocitos T dominante con la secuencia central LQPQNPSQQPQ (SEQ ID NO: 21). La versión desamidada por transglutaminasa de este péptido era más potente que el péptido no desamidado. Estudios previos sugieren que el péptido desamidado por transglutaminasa tendría la secuencia LQPENPSQEPE (SEQ ID NO: 22); pero se necesitan más estudios para confirmar esta secuencia. Entre los individuos sanos HLA-DQ2 (10) y HLA-DQ8 (1) que siguieron una dieta sin gluten durante un mes, las respuestas de linfocitos T específicas para el péptido de gliadina fueron poco frecuentes, rara vez se modificaron con la exposición a gluten, y nunca aparecieron epítopos de linfocitos T potentes con la exposición a gluten en individuos celíacos. En conclusión, no es probable que haya más de 6 epítopos de linfocitos T importantes en enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ2, de los cuales la A-gliadina 57-73 es el más potente. La enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ2 y a HLA-DQ8 no comparte la misma especificidad de linfocitos T.

Hemos demostrado que la exposición a gluten de corta duración de individuos con enfermedad celíaca después de una dieta sin gluten induce linfocitos T específicos de gliadina en sangre periférica. La frecuencia de estos linfocitos

T es máxima en sangre periférica el día 6 y después se desvanece rápidamente durante la siguiente semana. Los linfocitos T específicos de gliadina en sangre periférica expresan la integrina  $\alpha 4\beta 7$  que está asociada a la adhesión a la lámina propia del intestino. Hemos aprovechado este diseño de estimulación con antígeno humano para mapear los epítomos de linfocitos T relevantes para la enfermedad celíaca en la proteína arquetípica  $\alpha$ -gliadina del gluten, A-gliadina. Usando péptidos 15-mer superpuestos en 10 aminoácidos con y sin desamidación por transglutaminasa (tTG), hemos demostrado que los linfocitos T inducidos en sangre periférica inicialmente sólo están dirigidos a un péptido de A-gliadina, los restos 57-73 en los que se desamida la glutamina en posición 65. El epítomo está restringido a HLA-DQ2, consecuente con la asociación íntima de la enfermedad celíaca al HLA-DQ2.

- 10 La enfermedad celíaca es reactivada por exposición al trigo, el centeno y la cebada. La fracción  $\alpha/\beta$ -gliadina del gluten de trigo es tóxica de forma consistente en la enfermedad celíaca, y la mayoría de los estudios se han centrado en estas proteínas. El grupo de genes de codificación para las  $\alpha/\beta$ -gliadinas se encuentra en el cromosoma 6C del trigo. No hay homólogos de las  $\alpha/\beta$ -gliadinas en el centeno o la cebada. Sin embargo, los tres subtipos de gliadina del trigo ( $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\omega$ ) son tóxicos en la enfermedad celíaca. Los genes  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadina se encuentran en el cromosoma 1A en el trigo, y son homólogas a las secalinas y las hordeínas en centeno y cebada.

- En la actualidad hay genes identificados para 61  $\alpha$ -gliadinas en el trigo (*Triticum aestivum*). Las secuencias de la  $\alpha$ -gliadina son altamente homólogas, pero el epítomo dominante en A-gliadina deriva de la región más polimórfica en la secuencia de la  $\alpha$ -gliadina. Anderson y col., (1997) han estimado que hay un total de aproximadamente 150 genes de  $\alpha$ -gliadina distintos en *T. aestivum*, pero muchos son pseudogenes. Por lo tanto, es poco probable que los epítomos de linfocitos T relevantes para la enfermedad celíaca no estén incluidos dentro de las secuencias conocidas de la  $\alpha$ -gliadina.

- Nuestro trabajo ha identificado un grupo de péptidos de  $\alpha$ -gliadina desamida casi idénticos a la A-gliadina 57-73 como epítomos potentes de linfocitos T específicos para la enfermedad celíaca. Más del 90 % de los pacientes celíacos son HLA-DQ2+, y hasta ahora, sólo hemos evaluado individuos celíacos HLA-DQ2+ después de la exposición a gluten. Sin embargo, los pacientes celíacos que no expresan HLA-DQ2 portan casi todos HLA-DQ8. Por lo tanto, es fundamental saber si la A-gliadina 57-73 y sus homólogos en otras proteínas del gluten en trigo, centeno y cebada son los únicos epítomos de linfocitos T reconocidos por los linfocitos T inducidos por la exposición a gluten en enfermedad celíaca HLA-DQ2+ y HLA-DQ8+. Si este fuera el caso, el diseño de agentes terapéuticos peptídicos para la enfermedad celíaca podría requerir únicamente un péptido.

#### Homólogos de la A-gliadina 57-73 como epítomos de linfocitos T

- 35 Las búsquedas iniciales en las bases de datos de genes del SwissProt y TrEMBL para genes de cereales que codifican para la secuencia central de A-gliadina 57-73 (PQLPY <SEQ ID NO: 12>) sólo revelaron  $\alpha/\beta$ -gliadinas. Sin embargo, nuestros estudios de mapeo fino del epítomo de la A-gliadina 57-73 QE65 revelaron un número limitado de sustituciones puntuales permisivas en la región del núcleo (PQLP) (nótese que Q65 realmente está desamida en el epítomo). Por lo tanto, hemos extendido nuestra búsqueda de genes en las bases de datos del SwissProt o TrEMBL que codifican para péptidos con la secuencia de XXXXXXPQ[ILMP][PST]XXXXXX (SEQ ID NO: 23). Los homólogos se identificaron entre  $\gamma$ -gliadinas, gluteninas, hordeínas y secalinas (véase Tabla 12). Se identificó un homólogo más en  $\omega$ -gliadina por búsqueda visual de las tres entradas de  $\omega$ -gliadina en el GenBank.

- Estos homólogos de A-gliadina 57-73 se evaluaron después de la desamidación por tTG (o síntesis de la variante sustituida por glutamato (QE) en cuatro homólogos cercanos) usando el ensayo de ELISPOT para IFN- $\gamma$  con células mononucleares de sangre periférica después de la exposición a gluten en individuos celíacos. La secuencia de m-gliadina (AAG17702 141-157) era el único péptido bioactivo, aproximadamente la mitad de potente que la A-gliadina 57-73 (véase Tabla 12, y Figura 12). Por lo tanto, las búsquedas de homólogos del epítomo dominante de A-gliadina no tuvieron en cuenta la toxicidad de la  $\gamma$ -gliadina, secalinas, y hordeínas.

50

#### Métodos

##### Diseño de un grupo de péptidos que abarcan todos los posibles epítomos de linfocitos T para gliadina de trigo

- 55 Con el fin de identificar todos los posibles epítomos de linfocitos T codificados por los genes o fragmentos génicos conocidos de la gliadina (61 entradas para  $\alpha/\beta$ -, 47 entradas para  $\gamma$ -, y 3 entradas para  $\omega$ -gliadina en el Genbank) del trigo (*Triticum aestivum*), se alinearon secuencias de proteínas derivadas de genes con el software CustalW (MegAlign) y se dispusieron en grupos filogenéticos (véase Tabla 22). Muchas entradas representan truncamientos de secuencias más largas, y muchos segmentos génicos eran idénticos excepto por la longitud de las repeticiones

de poliglutamina o sustituciones raras. Por lo tanto, fue posible razonar todas las posibles secuencias de 12 aminoácidos únicos codificadas por genes conocidos del trigo que se deben incluir en un grupo de 652 péptidos 20-mer. (No se incluyeron las secuencias de los péptidos señal). Las secuencias de péptidos se enumeran en la Tabla 23.

5

#### *Mapeo integral de epítomos*

Se estudiaron individuos de control sanos (HLA-DQ2+ n = 10, y HLA-DQ8+ n = 1) que habían seguido una dieta sin gluten durante 4 semanas, y individuos celíacos (seis HLA-DQ2, cuatro heterocigóticos complejos HLA-DQ2/8, y tres HLA-DQ8/X) (véase Tabla 13) que habían seguido una dieta sin gluten de larga duración antes y el día 6 y 7 después de la exposición de 3 días a gluten (cuatro rebanadas de 50 g de pan blanco convencional - pan de molde de Sainsbury, cada día). Se recogió sangre periférica (un total de 300 ml durante los siete días) y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron mediante gradiente de densidad Lymphoprep. Las PBMC se incubaron con pools de 6 u 8 péptidos 20-mer, o péptidos individuales con o sin desamidación por tTG en ensayos ELISPOT para interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) durante toda la noche.

Los péptidos se sintetizaron en lotes de 96 como Pepsets (Mimotopes Inc., Melbourne Australia). Se proporcionó 0,6 micromoles aproximadamente de cada uno de los 652 20-mer. Se incluyeron dos péptidos 20-mer marcadores en cada grupo de 96 (VLQQHNIAHGSSQVLQESTY - péptido 161 (SEC ID NO: 24), y IKDFHVFYFRESRDALWKGPG (SEQ ID NO: 25)) y se caracterizaron por HPLC en fase inversa y análisis de la secuencia de aminoácidos. Las puridades promedio de estos péptidos marcadores fueron del 50 % y del 19 %, respectivamente. Los péptidos se disolvieron inicialmente en acetonitrilo (10 %) y Hepes 100 mM a 10 mg/ml.

La concentración final de péptidos individuales en los pools (o solos) incubados con PBMC para los ensayos de ELISPOT para IFN- $\gamma$  fue de 20  $\mu$ g/ml. Se tomaron alícuotas de soluciones concentradas cinco veces de péptidos y pools en PBS, cloruro de calcio 1 mM y se almacenaron en placas de 96 pocillos según el protocolo usado posteriormente en los ensayos ELISPOT. Se prepararon péptidos y pools de péptidos desamidados mediante la incubación con tTG tisular de conejillo de indias (Sigma T5398) en una relación de 100:32  $\mu$ g/ml durante dos horas a 37 °C. Las soluciones de péptidos se almacenaron a -20 °C y se descongelaron justo antes de su uso.

30

La gliadina (Sigma G3375) (100 mg/ml) en agua libre de endotoxinas y urea 2 M se llevó a ebullición durante 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se incubó con pepsina esterilizada por filtración (0,2  $\mu$ m) (Sigma P6887) (2 mg/ml) en HCl 0,02 M o quimotripsina (C3142) (4 mg/ml) en bicarbonato de amonio (0,2 M). Después de la incubación durante 4 horas, la gliadina digerida con pepsina se neutralizó con hidróxido de sodio, y a continuación la gliadina digerida con pepsina y digerida con quimotripsina se llevaron a ebullición durante 15 minutos. También se realizaron incubaciones idénticas con proteasa en las que se omitió la gliadina. Las muestras se centrifugaron a 15.000 g, y a continuación se estimaron las concentraciones de proteína en los sobrenadantes por el método de BCA (Pierce, EE.UU.). Antes de su uso final en los ensayos de ELISPOT para IFN- $\gamma$ , se incubaron alícuotas de gliadina-proteasa con tTG en una relación 2500:64  $\mu$ g/ml.

40

Se llevaron a cabo ensayos ELISPOT para IFN- $\gamma$  (Mabtech, Suecia) en placas de 96 pocillos (MAIP S-45, Millipore) en los que cada pocillo contenía 25  $\mu$ l de solución peptídica y 100  $\mu$ l de PBMC (2-8 x 10<sup>5</sup>/pocillo) en RPMI que contiene el 10 % de suero AB humano inactivado por calor. Se evaluaron pools de péptidos desamidados en una placa ELISPOT de 96 pocillos, y pools de péptidos sin desamidación en una segunda placa (con una distribución idéntica) tanto el día 0 como el día 6. Todos los pocillos en la placa que contiene los péptidos desamidados incluían tTG (64  $\mu$ g/ml). En cada placa ELISPOT había 83 pocillos con pools de péptidos (un pool único en cada pocillo), y una serie de pocillos para péptidos "control" (péptidos todos con una pureza > 90 %, que se caracterizaron por MS y HPLC, Research Genetics): P04722 77-93 (QLQFPQPQLPYQPQP (SEQ ID NO: 26)), P04722 77-93 QE85 (por duplicado) (QLQFPQPQLPYQPQP (SEQ ID NO: 27)), P02863 77-93 (QLQFPQPQLPYQPQP (SEQ ID NO: 28)), P02863 77-93 QE85 (QLQFPQPQLPYQPQP (SEQ ID NO: 29)), y la gliadina digerida con quimotripsina (500  $\mu$ g/ml), la gliadina digerida con pepsina (500  $\mu$ g/ml), quimotripsina sola (20  $\mu$ g/ml), pepsina sola (10  $\mu$ g/ml), y el blanco (PBS +/- tTG) (por triplicado).

50

Después del revelado y el secado, las placas ELISPOT para interferón gamma se evaluaron usando el contador de placas de ELISPOT automatizado MAIP. En individuos HLA-DQ2 sanos y celíacos, la inducción de los puntos formadores de células (sfc) por pools de péptidos en el ensayo ELISPOT para IFN- $\gamma$  se sometió a ensayo usando una prueba de rangos con signo apareados de una cola de Wilcoxon (usando el *software* SPSS) aplicada a los puntos de formación de células (sfc) por millón de PBMC menos el blanco, el día 6 frente al día 0 ("respuesta neta"). Una inducción significativa de una respuesta IFN- $\gamma$  a pools de péptidos en PBMC mediante exposición a gluten *in vivo* se

55

define como una "respuesta neta" media de al menos 10 sfc/millón de PBMC y un nivel de significación  $p < 0,05$ . Una respuesta significativa a un pool de péptidos particular el día 6 estuvo seguida de la valoración de los péptidos individuales dentro de cada pool usando la extracción de PBMC el mismo día o el día 7.

- 5 Para los ensayos ELISPOT para IFN- $\gamma$  de péptidos individuales, la bioactividad se expresó como porcentaje de la respuesta a P04722 77-93 QE85 evaluado en la misma placa de ELISPOT. La respuesta media al blanco (PBS solo) fue de 0,2 (intervalo 0-5) sfc por pocillo, y el control positivo (P04722 77-93 QE85) fue de 76,5 (intervalo: 25-282) sfc por pocillo usando una media de 0,36 millones (intervalo: 0,3-0,72) de PBMC. Por lo tanto, la respuesta media al blanco expresada como porcentaje de P04722 77-93 QE65 fue del 0,2 % (intervalo: 0-6,7). Se analizaron péptidos
- 10 individuales con bioactividad media superior al 10 % de la de P04722 QE85 para motivos estructurales comunes.

## Resultados

### *Individuos HLA-DQ2 sanos*

- 15 Ninguno de los individuos HLA-DQ2+ sanos que había seguido una dieta sin gluten durante un mes presentaba respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  a homólogos de la A-gliadina 57-73 antes o después de la exposición a gluten. Sin embargo, en 9/10 individuos sanos, la exposición a gluten estaba asociada a un incremento significativo en las respuestas de IFN- $\gamma$  a las digestiones de gliadina tanto con pepsina como con quimotripsina, de una media de 0-4
- 20 sfc/millones el día 0 a una media de 16-29 sfc/millones (véase Tabla 14). Las respuestas a gliadina en individuos sanos no se verán afectadas por la desamidación (véase Tabla 15). Entre los individuos sanos, no hubo una inducción consistente de respuestas de IFN- $\gamma$  a pools de péptidos de gliadina específicos con exposición a gluten (véase Figura 13, y Tabla 16). Ocasionalmente se encontraron respuestas de ELISPOT para IFN- $\gamma$ , pero estas fueron débiles, y no se vieron alteradas por la desamidación. Muchas de las respuestas más fuertes a los pools
- 25 también estaban presentes el día 0 (véase Tabla 17, individuos H2, H8 y H9). Cuatro individuos sanos sí mostraron respuestas definitivas al pool 50, y los dos con las respuestas más fuertes el día 6 también presentaban respuestas el día 0. En ambos individuos, las respuestas después de la exposición y las respuestas al pool 50 se debieron al péptido 390 (QQTYPQRPPQPPQTQQPQQ (SEQ ID NO: 30)).

### *Individuos HLA-DQ2 celíacos*

- Después de la exposición a gluten en pacientes celíacos HLA-DQ2+, las respuestas medias de ELISPOT para IFN- $\gamma$  a P04722 77-93 E85 aumentaron de una media de 0 a 133 sfc/millones (véase Tabla 4). Uno de los seis individuos celíacos (C06) no respondió a P04722 77-93 QE85 (2 sfc/millones) y sólo presentaba respuestas débiles a pools del
- 35 péptido de gliadina (máximo: pool 50 + tTG 27 sfc/millones). Consecuente con el trabajo anterior, la bioactividad de P04722 de tipo silvestre se incrementó 6,5 veces con desamidación por tTG (véase Tabla 15). Al inicio del estudio había presentes respuestas del interferón gamma a las digestiones de gliadina, pero se incrementaron sustancialmente mediante la exposición a gluten de una media de 20 hasta 92 sfc/millones para la gliadina sometida a quimotripsina y de 44 a 176 sfc/millones para la gliadina sometida a pepsina. La desamidación de la gliadina
- 40 incrementó la bioactividad en una media de 3,2 veces para la gliadina sometida a quimotripsina y de 1,9 veces para la gliadina sometida a pepsina (véase Tabla 15). (Cabe señalar que la acidez requerida para la digestión por pepsina es probable que produzca la desamidación parcial de la gliadina).

- En contraste con los individuos sanos, la exposición a gluten indujo respuestas ELISpot para IFN- $\gamma$  a 22 de los 83
- 45 pools tratados con tTG que incluyen los péptidos de las  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas (véase Figura 14, y Tabla 17). La bioactividad de los pools fue muy coherente entre individuos (véase Tabla 18). Las respuestas ELISpot para IFN- $\gamma$  provocadas por los pools de péptidos casi siempre se vieron incrementadas por la desamidación (véase Tabla 17). Pero la mejora de la bioactividad de los pools por la desamidación no fue tan marcada como para P04722 77-73 Q85, incluso para pools que incluyen los homólogos de A-gliadina 57-73. Esto sugiere que los péptidos Pepset se
- 50 desamidan parcialmente durante la síntesis o durante la preparación, por ejemplo los péptidos Pepset se administran en forma de sales del ácido trifluoroacético (TFA) después de la liofilización de una solución de TFA.

- Ciento setenta péptidos individuales desamidados por tTG procedentes de 21 de los pools más bioactivos se evaluaron por separado. Setenta y dos péptidos desamidados fueron más del 10 % tan bioactivos como P04722 77-93 QE85 a una concentración equivalente (20  $\mu$ g/ml) (véase Tabla 19). Los cinco péptidos más potentes (85-94 % de bioactividad de P04722 QE85) eran homólogos de la  $\alpha$ -gliadina A-gliadina 57-73 identificados previamente. Cincuenta de los péptidos bioactivos no eran homólogos de la A-gliadina 57-73, pero se podían dividir en seis familias de secuencias estructuralmente relacionadas (véase Tabla 20). Las secuencias más bioactivas de cada una de las familias de péptidos fueron: PQQPQQPQQPFPQPFPW (SEQ ID NO: 31) (péptido 626, 72 % de la

bioactividad media de QE85 P04722), QQPQQPFPOPQQPQLPFPQQ (SEQ ID NO: 32) (343, 34 %), QAFPQPQQTFPHQPQQQFPQ (SEQ ID NO: 33) (355, 27 %), TQQPQQPFPPQQPQQPFPQTQ (SEQ ID NO: 34) (396, 23 %), PIQPQQPFPPQQPQQPQFP (SEQ ID NO: 35) (625, 22 %), PQQSFSYQQQPFPPQQPYPPQQ (SEQ ID NO: 36) (618, 18 %) (las secuencias centrales están subrayadas). Todas estas secuencias incluyen restos de glutamina que se prevé que sean susceptibles a la desamidación por transglutaminasa (por ejemplo, QXP, QXPF (SEQ ID NO: 37), QXX[AF] (SEQ ID NO: 38)) (véase Vader y col., 2002). Algunos péptidos bioactivos contienen dos secuencias centrales de diferentes familias.

Consistente con la posibilidad de que diferentes poblaciones de linfocitos T respondan a péptidos con secuencias centrales distintas, la bioactividad de los péptidos de diferentes familias parece ser aditiva. Por ejemplo, la bioactividad media del pool 81 tratado con tTG fue del 141 % de P04722 QE85, mientras que la bioactividad de los péptidos individuales fue, en orden de importancia: Péptido 631 (homólogo de A-gliadina 57-73) 61 %, 636 (homólogo de 626) 51 %, y 635 19 %, 629 16 %, y 634 13 % (todos ellos homólogos de 396).

Aunque probablemente sea una simplificación excesiva, la contribución de cada "familia de péptidos" a la respuesta ELISpot para IFN- $\gamma$  sumada a los péptidos de gliadina se comparó en los individuos celíacos HLA-DQ2+ (véase Figura 15). En consecuencia, la contribución de P04722 77-73 E85 a la respuesta sumada a los péptidos de gliadina está entre 1/5 y 2/3.

Usando el programa de búsqueda de homología en péptidos, WWW PepPepSearch, al que se puede acceder a través de la World Wide Web de Internet en, por ejemplo, "cbrg.inf.ethz.ch/subsection3\_1\_5.html", y por comparación directa con secuencias del GenBank para secalinas de centeno, no se encontraron coincidencias exactas para la secuencias centrales QQPFPQPQQPFP (SEQ ID NO: 39) en hordeínas de cebada (HOR8) y secalinas de centeno (A23277, CAA26449, AAG35598), QQPFPQPQQPFP (SEQ ID NO: 40) en hordeínas de cebada (HOG1 y HOR8), y para PIQPQQPFPPQQP (SEQ ID NO: 41) también en hordeínas de la cebada (HOR8).

#### *Enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ8*

Siete individuos celíacos HLA-DQ8+ se sometieron a estudio antes y después de la exposición a gluten. Cinco de estos individuos HLA-DQ8+ (HLA-DQA0\*0301-3, HLA-DQB0\*0302) también portaban uno o los dos complejos HLA-DQ2 (DQA0\*05, DQB0\*02) asociados a la enfermedad celíaca. Dos de los tres individuos con ambos complejos HLA-DQ asociados a enfermedad celíaca presentaban respuestas potentes a pools de péptidos de gliadina (y péptidos individuales, incluyendo P04722 77-93 E85) que eran cualitativa y cuantitativamente idénticos a individuos celíacos HLA-DQ2 (véase Figuras 16 y 17, y Tabla 18). El pool de péptidos desamidados 74 era bioactivo en ambos individuos HLA-DQ2/8, pero sólo en uno de los 6 individuos HLA-DQ2/X. El tratamiento previo del pool 74 con tTG mejora la bioactividad entre 3,8 y 22 veces, y la bioactividad del pool 74 tratado con tTG en los tres individuos que presentan respuesta es equivalente a entre el 78 % y el 350 % de la bioactividad de P04722 77-93 E85. Actualmente, no se sabe qué péptidos son bioactivos en el pool 74 en los individuos C02, C07, y C08.

Dos de los cuatro individuos celíacos HLA-DQ8 que carecían de uno o de los dos alelos HLA-DQ2 asociados a la enfermedad celíaca mostraron respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  muy débiles a los pools de péptidos de la gliadina, pero los otros dos respondieron tanto a la gliadina digerida por proteasa como a los pools de péptidos específicos. El individuo C12 (HLA-DQ7/8) respondió enérgicamente a los pools 1-3 desamidados (véase Figura 18). La evaluación de los péptidos individuales en estos pools permitió la identificación de una serie de péptidos bioactivos estrechamente relacionados, incluyendo la secuencia central LQPQNPSQQQPQ (SEQ ID NO: 42) (véase Tabla 20). El trabajo previo (por nosotros) ha demostrado que tres restos de glutamina en esta secuencia son susceptibles a la desamidación mediada por tTG (subrayado). Las búsquedas de homología utilizando WWW PepPepSearch han identificado coincidencias próximas a LQPQNPSQQQPQ (SEQ ID NO: 43) sólo en  $\alpha$ -gliadinas de trigo.

El cuarto individuo HLA-DQ8 (C11) tuvo respuestas ELISpot para IFN- $\gamma$  inducibles al pool 33 tratado con tTG (véase Figura 19). Los pools 32 y 33 incluyen polimorfismos del epítipo de gliadina definido previamente restringido a HLA-DQ8 (QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO: 44)) activo después de desamidación con tTG (las Gln subrayadas se desamidan y confieren bioactividad) (van der Wal y col., 1998). Actualmente, no se sabe qué péptidos son bioactivos en el pool 33 en el individuo C11.

Así, el mapeo integral del epítipo de linfocitos T en la enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ2 usando la exposición a gluten *in vivo* y un grupo de 652 péptidos que abarcan las 12 secuencias de aminoácidos conocidas en gliadina del trigo ha identificado al menos 72 péptidos un 10 % tan bioactivos como el epítipo conocido de la  $\alpha$ -gliadina, A-gliadina 57-73 E65. Sin embargo, estos péptidos bioactivos se pueden reducir a un grupo de quizás sólo



5 familias de péptidos distintas, pero estrechamente relacionadas. Casi todos estos péptidos son ricos en prolina, glutamina, fenilalanina y/o tirosina e incluyen la secuencia PQ(QL)P(FY)P (SEQ ID NO: 45). Esta secuencia facilita la desamidación de Q en posición 2 por tTG. Por analogía con la desamidación de la A-gliadina 57-68 (Arentz-Hansen 2000), el aumento de la bioactividad de estos péptidos que generalmente se encuentra con la desamidación por tTG se puede deber a una mayor afinidad de unión por HLA-DQ2.

Es posible la reactividad cruzada entre linfocitos T *in vivo* que reconocen más de uno de estos péptidos de gliadina bioactivos. Sin embargo, si cada grupo de péptidos relacionados activa una población de linfocitos T distinta *in vivo*, el epítipo correspondiente a la A-gliadina 57-73 E65 es el más potente y generalmente es reconocido por al menos el 40 % de los linfocitos T de sangre periférica que secretan IFN- $\gamma$  en respuesta a la gliadina después de la exposición a gluten.

No se encontraron respuestas específicas para el péptido de gliadina en la enfermedad celíaca HLA-DQ2/8 que difirieran cualitativamente de las de la enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ2/X. No obstante, los linfocitos T en sangre periférica en individuos celíacos HLA-DQ8+ sin los dos alelos HLA-DQ2 no reconocían los homólogos de A-gliadina 57-73 E65. En dos HLA-DQ8+ celíacos eran dominantes dos epítipos diferentes. El epítipo dominante en uno de estos individuos HLA-DQ8+ no ha sido identificado previamente (LQPQNPSQQQPQ (SEQ ID NO: 46)).

Teniendo en cuenta las enseñanzas de este documento, el diseño de una inmunoterapia para la enfermedad celíaca utilizando todos los epítipos de linfocitos T reconocidos habitualmente es práctico y puede incluir menos de seis péptidos diferentes. Los epítipos en  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas de trigo también están presentes en hordeínas de la cebada y en secalinas del centeno.

#### Ejemplo 14

Se realizaron varios ensayos ELISPOT como se ha descrito anteriormente y produjeron los siguientes resultados y/o conclusiones:

##### Examen de múltiples polimorfismos de $\alpha$ -gliadina con PQLPY

Agonistas potentes de la A-gliadina 57-73QE (G01) incluyen

QLQPFPPQPELPYPQPQS (G01), PQL-Y-----P (G10), and PQQPFPL-  
----- (G12). Los menos potentes incluyen-----L-----P (G04), -----  
R-----P (G05), and -----S-----P (G06). Los menos potentes todavía  
incluyen-----L-----S-----P (G07), -----S-----S-----P (G08), -----  
-----S--S-----P (G09), and PQQPFPP----- (G13). Las líneas indican

identidad con la secuencia G01 en la posición particular.

*La exposición a gluten induce linfocitos T de A-gliadina 57-73 QE65 después de sólo dos semanas de dieta sin gluten en enfermedad celíaca de nuevo diagnóstico*

Análisis adicionales indicaron que las respuestas de gliadina desamidada por tTG cambian después de dos semanas de dieta sin gluten en la enfermedad celíaca de nuevo diagnóstico. Otros análisis indican que los linfocitos T específicos de gliadina desamidada son restringido a HLA-DQ2 CD4+ $\alpha$ <sub>4</sub> $\beta$ <sub>7</sub>+

##### Epítipo óptimo (clones frente a la exposición a gluten)

Un epítipo "dominante" se define mediante ELISPOT para IFN- $\gamma$  después de la exposición a gluten. QLQPFPPQPELPYPQPQS (100 % de respuesta ELISpot). Epítipos definidos por clones de linfocitos T intestinales: QLQPFPPQPELPY (27 %), PQPELPYPQPELPY (52 %), y QQLPQPEQPQQSFPEQERPF (9 %).

*Dominancia entre las respuestas de péptidos individuales*

La dominancia depende del trigo o del centeno. En cuanto al trigo, los péptidos dominantes incluyen los péptidos número 89, 90 y 91 (en referencia a los números de secuencia en la Tabla 23). Para el centeno, los péptidos dominantes incluyen los péptidos número 368, 369, 370, 371 y 372 (en referencia a los números de secuencia en la Tabla 23). Algunos péptidos, incluidos 635 y 636 (en referencia a los números de secuencia en la Tabla 23) mostraron actividad tanto en centeno como en trigo.

10 *La exposición a gluten in vivo permite definir la jerarquía de los epítomos de linfocitos T para la enfermedad celíaca*

La jerarquía de los epítomos es consistente entre celíacos HLA-DQ2+ pero diferente para celíacos HLA-DQ8+. La jerarquía depende del cereal que se consume. La desamidación genera casi todos los epítomos de gliadina. HLA-DQ2, DQ8, y DR4 presentan péptidos desamidados. La enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ2/8 preferentemente presenta epítomos de gliadina asociados a DQ2. Los epítomos de gliadina están suficientemente restringidos como para justificar el desarrollo de terapias basadas en epítomos.

Otros análisis indicaron lo siguiente: HLA-DR3-DQ2 (85-95 %) y HLA-DR4-DQ8 (5-15 %).

20 Otros análisis indicaron lo siguiente:

|     | HLA-DQ | Alelo HLA-DQA1 | Alelo HLA-DQB1 | Histología<br>duodenal | Sin Gluten | EMA con gluten<br>(en DSG) |
|-----|--------|----------------|----------------|------------------------|------------|----------------------------|
| C01 | 2,6    | 102/6, 501     | 201, 602       | AVS                    | 1 año      | +(-)                       |
| C02 | 2,2    | 501            | 201            | AVS                    | 1 año      | +(-)                       |
| C03 | 2,5    | 101/4/5, 501   | 201, 501       | AVP                    | 1 año      | +(-)                       |
| C04 | 2,5    | 101/4/5, 501   | 201, 501       | AVS                    | 7 año      | +(-)                       |
| C05 | 2,2    | 201, 501       | 201, 202       | AVS                    | 4 meses    | +(ND)                      |
| C06 | 2,2    | 201, 501       | 201, 202       | AVS                    | 2 año      | +(-)                       |
| C07 | 2,8    | 301-3, 501     | 201, 302       | AVS                    | 1 año      | +(-)                       |
| C08 | 2,8    | 301-3, 501     | 201, 302/8     | AVS                    | 11 año     | ND (-)                     |
| C09 | 2,8    | 301-3, 501     | 201, 302       | AVS                    | 29 año     | +(-)                       |
| C10 | 2,8    | 201, 301-3     | 202, 302       | IEL                    | 1 año      | +(-)                       |
| C11 | 6,8    | 102/6, 301-3   | 602/15, 302/8  | IEL                    | 9 meses    | - (ND)                     |
| C12 | 8,7    | 301-3, 505     | 302, 301/9-10  | AVS                    | 2 año      | -(-)                       |
| C13 | 8,8    | 301            | 302            | AVS                    | 1 año      | +(+)                       |

Se llevó a cabo otro análisis para determinar la bioactividad de péptidos individuales desamidados con tTG en los pools 1-3 en el individuo C12. Los resultados son los siguientes (los números de secuencia se refieren a los péptidos enumerados en la Tabla 23): Secuencia 8 (100 %), Secuencia 5 (85 %), Secuencia 6 (82 %), Secuencia 3 (77 %), Secuencia 1 (67 %), Secuencia 2 (59 %), Secuencia 9 (49 %), Secuencia 7 (49 %), Secuencia 10 (33 %), Secuencia 4 (15 %), Secuencia 12 (8 %), Secuencia 11 (0 %), Secuencia 23 (26 %), Secuencia 14 (18 %), Secuencia 15 (18 %), Secuencia 17 (18 %), Secuencia 16 (13 %), Secuencia 14 (8 %), Secuencia 22 (5 %), Secuencia 18 (3 %), Secuencia 19 (3 %), Secuencia 20 (0 %), Secuencia 21 (0 %). La secuencia desamidada predicha es LQPENPSQEQPE.

*Respuestas a ELISPOT individuales por PBMC (puntos formadores de células determinados por el lector ELISPOT)*

| Péptido (véase Tabla 23) | C01 | C02 | C03 | C04 | C05 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65                       | 16  | 2   | 1   | 2   | 3   |
| 66                       | 32  | 6   | 13  | 0   | 6   |
| 67                       | 16  | 3   | 4   | 0   | 4   |
| 68                       | 25  | 8   | 4   | 2   | 2   |
| 69                       | 4   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 70                       | 2   | 1   | 0   | 0   | 0   |
| 71                       | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   |
| 72                       | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 73                       | 95  | 21  | 42  | 31  | 31  |
| 74                       | 122 | 15  | 29  | 21  | 28  |
| 75                       | 5   | 1   | 2   | 2   | 5   |
| 76                       | 108 | 13  | 28  | 16  | 22  |
| 77                       | 3   | 0   | 1   | 0   | 1   |
| 78                       | 21  | 2   | 3   | 5   | 3   |
| 79                       | 20  | 0   | 2   | 0   | 2   |
| 80                       | 5   | 2   | 0   | 0   | 3   |
| 81                       | 4   | 1   | 2   | 3   | 1   |
| 82                       | 3   | 3   | 5   | 2   | 2   |
| 83                       | 14  | 2   | 0   | 0   | 1   |
| 84                       | 3   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 85                       | 14  | 1   | 2   | 1   | 2   |
| 86                       | 11  | 0   | 2   | 0   | 2   |

##### 5 Reactividad cruzada

Para tratar los datos de 652 péptidos en 29 individuos, o para determinar cuándo una respuesta particular es una verdadera respuesta positiva de linfocitos T específica para el péptido, o para determinar cuándo una respuesta a un péptido es debida a la reactividad cruzada con otro péptido relacionado estructuralmente, la expresión de una respuesta a un péptido particular puede estar como porcentaje de una respuesta de un péptido "dominante". De manera alternativa, la expresión puede ser una "relación", como coeficientes de correlación entre las respuestas de péptidos, o por medios bioinformáticos.

##### *Epítomos adicionales*

Un resultado representativo es como sigue:

Combinación de péptidos con P04722E (todos 20 µg/ml) (n = 4)

## ES 2 510 440 T3

|         | Solo | P04722E + |
|---------|------|-----------|
| Pep 626 | 60   | 135       |
| P04722E | 100  | 110       |
| HLAa    | 0    | 85        |

(Expresado como porcentaje de P04722E)

5 626 + tTG: PQQPQQPQQPFPQPQQPFPW

P04724E: QLQPFPPQPELPYPQPQL

Desamidación con tTG del péptido 626 (n = 12)

10

Sin tTG = 100 %

tTG = 170 %

15 *Sustitución en posiciones particulares*

Sustitución del péptido 626 PQQP[Q1]QP[Q2]QPFPPQ[Q3]QPFPPW (n = 12)

|    | Glu | Arg |
|----|-----|-----|
| Q1 | 95  | 90  |
| Q2 | 145 | 80  |
| Q3 | 155 | 10  |

20 (Expresado como porcentaje del péptido de tipo silvestre)

Bioactividad de 15-mer tratados con tTG que abarcan el Péptido 626/627

(PQQPQQPQQPFPQPQQPFPWQP) (n = 8)

25

P1-15. 5

P2-16. 4

30

P3-17. 3

P4-18. 38

P5-19. 65

35

P6-20. 95

P7-21. 65

40

P8-22. 90

(expresado como porcentaje de la respuesta máxima del 15-mer)

45

*Múltiples epítomos:*

P04724E: QLQPFQPQLPYQPQL

5 626 + tTG: PQQPQQPQQPFPQQPFPW

Epítomo mínimo: QPQQPFPQPQQPFPW

La depleción inmunomagnética de PBMC por cuentas recubiertas con anti-CD4 y por anti-integrina  $\beta_7$  agotó las  
10 respuestas de ELISPOT para IFN- $\gamma$ , mientras que la depleción inmunomagnética de PBMC por cuentas recubiertas  
con anti-CD8 o anti-integrina  $\alpha_4\beta_7$ . Por lo tanto, las PBMC secretoras de IFN- $\gamma$  son CD4+ y  $\alpha_4\beta_7+$ , asociadas a la  
adhesión a la lámina propia en el intestino.

Bloqueo por el anticuerpo anti-DQ pero no por anticuerpo anti-DR en individuos heterocigóticos y homocigóticos  
15 para HLA-DQ2. Esto puede implicar múltiples epítomos dentro de una secuencia.

*Epítomos de linfocitos T en la enfermedad celíaca*

Otros investigadores han caracterizado ciertos epítomos de clones de linfocitos T intestinales. Véase, por ejemplo,  
20 Vader y col., Gastroenterology 2002, 122: 1729-1737; Arentz-Hansen y col., Gastroenterology 2002, 123: 803-809.  
Estos son ejemplos de epítomos cuya relevancia está, en el mejor de los casos, poco clara debido a las técnicas *in*  
*vitro* usadas para clonar los linfocitos T.

Clones intestinales frente a clones de sangre periférica

25 Intestinal: 1) biopsias intestinales, 2) clones de linfocitos T generados contra las digestiones péptica-trípticas de  
gluten, 3) todos restringidos a HLA-DQ2, 4) clones que responden a la gliadina desamidada por transglutaminasa.

Sangre periférica: 1) los clones de linfocitos T generados contra el gluten están restringidos a HLA-DR, DQ y DP.  
30 Resultado: los clones de linfocitos T intestinales se pueden usar exclusivamente para mapear epítomos asociados a  
la enfermedad celíaca.

GDA\_9 de Trigo de 307 aa. Definición del Precursor alfa/beta-gliadina MM1 (Prolamina) N° de acceso P18573 -  
GenBank (que se incorpora aquí en su totalidad por referencia)

35 *Epítomos de clones de linfocitos T intestinales*

Una definición de epítomos de clones de linfocitos T intestinales se puede encontrar, por ejemplo, en Arentz-Hansen  
y col., J Exp Med. 2000, 191: 603-12. Allí también se describen epítomos de gliadina para clones de linfocitos T  
40 intestinales. La secuencia QLQPFQPQLPY desamidada es un epítomo, con una secuencia desamidada de  
QLQPFQPPELPY. Hay una restricción de HLA-DQ2. Una búsqueda de homología muestra que otras alfa-gliadinas  
bioactivas incluyen PQPQLPY individualmente o duplicada. La mayoría de los clones de linfocitos T responden a/o  
DQ2- $\alpha$ I: QLQPFQPPELPY DQ2- $\alpha$ II: PQPELPYPQPELPY

45 *Epítomos dominantes de linfocitos T para gliadina*

Todos desamidados por transglutaminasa.

Sangre periférica, día 6, después de exposición a gluten: A-gliadina 57-73:

50 QLQPFQPPELPYPQPQS

Clones de linfocitos T intestinales: DQ2- $\alpha$ I: QLQPFQPPELPY DQ2- $\alpha$ II: PQPELPYPQPELPY

55

*Mapeo de epítomos de clones de linfocitos T intestinales*

|             |         |                    |
|-------------|---------|--------------------|
| α-gliadinas | A1      | PFPQPQLPY          |
|             | A2      | PQPQLPYPQ          |
|             | A3      | PYPQPQLPY          |
| Γ-gliadinas | Glia-20 | PQQPYQPQPQ         |
|             | G1      | PQQSFPQQQ          |
|             | G2      | IIPQQPAQ           |
|             | G3      | FPQQPQQPYQPQ       |
|             | G4      | FSQPQQQFPQPQ       |
|             | G5      | LQPQQPFPQQPQQPYQPQ |
|             | Glu-21  | QSEQSQQPFPQQF      |
|             | Glu-5   | Q(IL)PQQPQQF       |
| Glutenina   | Glt-156 | PFSQQQQSPF         |
|             | Glt-17  | PFSQQQQQ           |

5 *Exposición al gluten e inducción de linfocitos T específicos para A-gliadina 57-73QE65 que segregan IFN-γ en sangre periférica*

Enfermedad celiaca sin tratar, seguido de dieta sin gluten durante 1, 2, ó 8 semanas, seguido por la exposición al gluten (3 días con 200 g de pan/día), seguido por dieta sin gluten.

10

Resultado 1: Duración de las respuestas a la dieta sin gluten y ELISPOT para IFN-γ el día 0 y el día 6 de la exposición a gluten: A-gliadina 57-73 QE65 (los resultados se expresaron como puntos específicos de IFN-γ/millones de PPBMC)

15 Día 0: ninguno (5), 1 semana (1), 2 semanas (2), 8 semanas (1)

Día 6: ninguno (0), 1 semana (4), 2 semanas (28), 8 semanas (48)

Resultado 2: Duración de las respuestas a la dieta sin gluten y ELISPOT para IFN-γ el día 0 y el día 6 de la exposición a gluten: gliadina con tTG (resultados expresados como puntos específicos de IFN-γ/millones de PPBMC)

20

Día 0: ninguno (45), 1 semana (62), 2 semanas (5), 8 semanas (5)

Día 6: ninguno (0), 1 semana (67), 2 semanas (40), 8 semanas (60)

25

Resultado 3: Duración de las respuestas a la dieta sin gluten y ELISPOT para IFN-γ el día 0 y el día 6 de la exposición a gluten: A-gliadina 57-73 P65 (los resultados se expresaron como puntos específicos de IFN-γ/millones de PPBMC)

30 Día 0: ninguno (1), 1 semana (2), 2 semanas (1), 8 semanas (1)

Día 6: ninguno (0), 1 semana (0), 2 semanas (0), 8 semanas (0)

Resultados 4: Duración de las respuestas a la dieta sin gluten y ELISPOT para IFN-γ el día 0 y el día 6 de la exposición a gluten: PPD (los resultados se expresaron como puntos específicos de IFN-γ/millones de PPBMC)

35

Día 0: ninguno (90), 1 semana (88), 2 semanas (210), 8 semanas (150)

Día 6: ninguno (0), 1 semana (100), 2 semanas (210), 8 semanas (100)

- 5 Resultados 5: Duración de las respuestas a la dieta sin gluten y ELISPOT para IFN- $\gamma$  el día 0 y el día 6 de la exposición a gluten: tTG (los resultados se expresaron como puntos específicos de IFN- $\gamma$ /millones de PPBMC)

Día 0: ninguno (5), 1 semana (4), 2 semanas (3), 8 semanas (2)

- 10 Día 6: ninguno (0), 1 semana (4), 2 semanas (1), 8 semanas (2)

*Exposición a gluten en la enfermedad celíaca HLA-DQ2 con gluten a largo plazo*

- 15 La caracterización de las respuestas de los linfocitos T dirigidos contra gliadina se llevó a cabo en sangre periférica el día 6-8 después de 3 días de exposición a gluten.

Resultado 1: PBMC, Día 6, dieta sin gluten a largo plazo (preincubación con anticuerpo anti-HLA-DR y anti-DQ) (expresado como % de inhibición)

- 20 DR-: gliadina con tTG 100  $\mu$ g/ml (105), A-gliadina 57-73 QE65 50  $\mu$ g/ml (90), PPD 5  $\mu$ g/ml (30)

DQ-: gliadina con tTG 100  $\mu$ g/ml (5), A-gliadina 57-73 QE65 50  $\mu$ g/ml (22), PPD 5  $\mu$ g/ml (78).

- 25 Resultado 2: PBMC, Día 6, dieta sin gluten a largo plazo (expresado como % de respuesta de PBMC agotadas en CD8)

Depleción de B7: gliadina con tTG n = 6 (7), A-gliadina 57-73 n = 9 (6), PPD n = 8 (62)

Depleción de AE: gliadina con tTG n = 6 (120), A-gliadina 57-73 n = 9 (80), PPD n = 8 (110).

- 30 Depleción de CD4: gliadina con tTG n = 6 (10), A-gliadina 57-73 n = 9 (9), PPD n = 8 (10).

Los péptidos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a

- 35 QLQPFQPQLPYPQPQS (AG01)

QLQPFQPQLPYPQPQP (AG02)

QLQPFQPQLPYPQPQL (AG03)

- 40 QLQPFQPQLPYLQPQP (AG04)

QLQPFPRPQLPYPQPQP (AG05)

- 45 QLQPFQPQLPYSQPQP (AG06)

QLQPFLQPQLPYSQPQP (AG07)

QLQPFSQPQLPYSQPQP (AG08)

- 50 QLQPFQPQLSYSQPQP (AG09)

PQLPYPQPQLPYPQPQP (AG10)

- 55 PQLPYPQPQLPYPQPQL (AG11)

PQPQPFLPQLPYPQPQS (AG12)

PQPQFPQPQLPYPQPQS (AG13)

PQPQPFPPQLPYPQYQP (AG14)

PQPQPFPPQLPYPQPPP (AG015)

5

Brevemente después de la exposición al antígeno oral, las especificidades de linfocitos T de sangre periférica reflejan las de clones de linfocitos T intestinales. En sangre periférica, los epítomos de clones de linfocitos T intestinales son sub-óptimos en comparación con la A-gliadina 57-73 QE65, que es un epítomo de  $\alpha$ -gliadina óptimo.

## 10 Ejemplo 17

La Tabla 24 muestra los resultados de los análisis que examinan los 652 péptidos con varios pacientes expuestos a trigo o a centeno.

## 15 Referencias

1. Molberg O, y col. Nature Med. 4, 713-717 (1998).
2. Quarsten H, y col. Eur. J. Immunol. 29, 2506-2514 (1999).
3. Greenberg CS y col. FASEB 5, 3071-3077 (1991).
4. Mantzaris G, Jewell D. Scand. J. Gastroenterol. 26, 392-398 (1991).
5. Mauri L, y col. Scand. J. Gastroenterol. 31, 247-253 (1996).
6. Bunce M, y col. Tissue Antigens 46, 355-367 (1995).
7. Olerup O, y col. Tissue antigens 41, 119-134 (1993).
8. Mullighan CG, y col. Tissue-Antigens. 50, 688-92 (1997).
9. Plebanski M y col. Eur. J. Immunol. 28,4345-4355 (1998).
10. Anderson DO, Greene FC. The alpha-gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes. Theor Appl Genet (1997) 95:59-65.
11. Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, Quarsten H, Van der Wal Y, Kooy YMC, Lundin KEA, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SN. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a.
12. Vader LW, de Ru A, van der Wal, Kooy YMC, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P, Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. J Exp Med 2002; 195:643-649.
13. van der Wal Y, Kooy Y, van Veelan P, Pena S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. J Immunol. 1998; 161:1585-8.
14. van der Wal Y, Kooy Y, van Veelan P, Pena S, Mearin L, Molberg O, Lundin KEA, Sollid L, Mutis T, Benckhuijsen WE, Drijfhout JW, Koning F. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:10050-10054.
15. Vader W, Kooy Y, Van Veelen P y col. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. Gastroenterology 2002, 122:1729-37
16. Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, y col. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadin rich in proline residues. Gastroenterology 2002, 123:803-809.



**Tabla 1. Secuencia de la proteína A-gliadina (basado en la secuenciación de aminoácidos)**

```

VRVPVPLQLP QNPSQQQPE QVPLVQQQF PGQQQFFPQ QPYQPQPF SQQPYLQLP FPOQLPYPQ
1      11      21      31      41      51      61
PQSEPPQQPY PQPQPYSP QQPISQQQA QQQQQQQQQ QQQILQQIL QQLPCMDVV LQQHNLHAR
71      81      91      101      111      121      131
SQVLQQSTYQ LLQELCCQHL WQIPEQSQCQ AJHNVVHAI LHQQKQQQQ PSSQVSTQPF LQQYP LGQGS
141      151      161      171      181      191      201
FRPSQQNPQA QGSVQPQLP QFEEIRNLAL QTLPAMCNVY IATYCTIAPF GIFGTN
211      221      231      241      251      261
    
```

5

**Tabla 2. Individuos estudiados con enfermedad celíaca**

| Edad | Sexo | Dieta sin gluten | HLA-DQ 2       | Estimulación con pan | Síntomas con pan                                   |
|------|------|------------------|----------------|----------------------|----------------------------------------------------|
| 1    | 64 f | 14 años          | Homocigótico   | 3 días               | Dolor abdominal, letargo, úlceras bucales, diarrea |
| 2    | 57 m | 1 año            | Heterocigótico | 10 días              | Letargo, náuseas                                   |
| 3    | 35 f | 7 años           | Heterocigótico | 3 días               | Náuseas                                            |
| 4    | 36 m | 6 sem            | Homocigótico   | 3 días               | Dolor abdominal, úlceras bucales, diarrea          |
| 5    | 26 m | 19 años          | Heterocigótico | 3 días               | Ninguno                                            |
| 6    | 58 m | 35 años          | Heterocigótico | 3 días               | Ninguno                                            |
| 7    | 55 m | 1 año            | Heterocigótico | 3 días               | Diarrea                                            |
| 8    | 48 f | 15 años          | Homocigótico   | 3 días               | Dolor abdominal, diarrea                           |

10

**Tabla 3**

| Aminoácido en la posición 65 | Intervalo | Media |
|------------------------------|-----------|-------|
| Glutamato                    | (100)     | 100 % |
| Asparagina                   | (50-84)   | 70 %  |
| Aspartato                    | (50-94)   | 65 %  |
| Alanina                      | (44-76)   | 64 %  |
| Cisteína                     | (45-83)   | 62 %  |
| Serina                       | (45-75)   | 62 %  |
| Valina                       | (24-79)   | 56 %  |
| Treonina                     | (46-66)   | 55 %  |
| Glicina                      | (34-47)   | 40 %  |
| Leucina                      | (8-46)    | 33 %  |
| Glutamina                    | (16-21)   | 19 %  |

| Aminoácido en la posición 65 | Intervalo | Media |
|------------------------------|-----------|-------|
| Isoleucina                   | (3-25)    | 14 %  |
| Metionina                    | (3-32)    | 14 %  |
| Fenilalanina                 | (0-33)    | 12 %  |
| Histidina                    | (0-13)    | 8 %   |
| Tirosina                     | (0-17)    | 8 %   |
| Triptófano                   | (0-17)    | 8 %   |
| Lisina                       | (0-11)    | 4 %   |
| Prolina                      | (0-4)     | 2 %   |
| Arginina                     | (0-2)     | 1 %   |

**Tabla 4**

| Respuesta Elispot |              | Secuencia peptídica | Restos correspondientes en las secuencias de proteínas gliadina (nº de acceso) |                                                                                |
|-------------------|--------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| oTG               | TG           |                     |                                                                                |                                                                                |
| (1-13)            |              | QLQPFQPQLPYPQPQS    | 57-73                                                                          | $\alpha$ -gliadina ( <i>T. aestivum</i> ) Q41545                               |
|                   | 100 (100)    | QLQPFQPQLPYPQPQS    | 57-73                                                                          | $\alpha$ -gliadina ( <i>T. aestivum</i> ) Q41545                               |
| (1-7)             | 53(44-67)    | QLQPFQPQLPYSQPQP    | 77-93                                                                          | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina ( <i>Trisetum aestivum</i> ) P02863         |
|                   |              |                     | 76-92                                                                          | $\alpha$ -gliadina ( <i>T. aestivum</i> ) Q41528                               |
|                   |              |                     | 77-93                                                                          | proteína de almacenamiento de $\alpha$ -gliadina Q41531 ( <i>T. aestivum</i> ) |
|                   |              |                     | 57-73                                                                          | péptido maduro $\alpha$ -gliadina ( <i>T. aestivum</i> ) Q41533                |
|                   |              |                     | 77-93                                                                          | precursor $\alpha$ -gliadina ( <i>T. spelta</i> ) Q9ZP09                       |
| 2<br>(0-20)       | 83(61-113)   | QLQPFQPQLPYPQPQP    | 77-93                                                                          | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina A-II ( <i>T. aestivum</i> ) P0472           |
| 9<br>(0-33)       | 83(74-97)    | QLQPFQPQLPYPQPQL    | 77-93                                                                          | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina A-IV ( <i>T. aestivum</i> ) P04724          |
|                   |              |                     | 77-93                                                                          | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina MM1 ( <i>T. aestivum</i> ) P18573           |
| (0-7)             | 109 (41-152) | PQLPYPQPQLPYPQPQP   | 84-100                                                                         | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina A-IV ( <i>T. aestivum</i> ) P04724          |

| Respuesta Elispot |           | Secuencia peptídica | Restos correspondientes en las secuencias de proteínas gliadina (nº de acceso) |                                                                                |
|-------------------|-----------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| ID                |           | PQLPYPQPQLPYPQPQL   | 84-100                                                                         | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina MM1 ( <i>T. aestivum</i> ) P18573           |
| (0-1)             | 3(0-7)    | QLQPFLQPQLPYSQPQP   | 77-93                                                                          | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina AI ( <i>T. aestivum</i> ) P04721            |
|                   |           |                     | 77-93                                                                          | $\alpha$ -gliadina ( <i>T. aestivum</i> ) Q41509                               |
| (0-0)             | 2(0-7)    | QLQPFSQPQLPYSQPQP   | 77-93                                                                          | proteína de almacenamiento de $\alpha$ -gliadina Q41530 ( <i>T. aestivum</i> ) |
| ID                |           | PQPQPFPPQLPYPQTQP   | 77-93                                                                          | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina A-III ( <i>T. aestivum</i> ) P04723         |
| 7<br>(0-40)       | 24(11-43) | PQPQPFPPQLPYPQPQS   | 82-98                                                                          | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina A-V ( <i>T. aestivum</i> ) P04725           |
| 0<br>(0-30)       | 19(11-33) | PQPQPFPPQLPYPQPPP   | 82-98                                                                          | clon precursor $\alpha/\beta$ -gliadina PW1215 ( <i>T. aestivum</i> ) P04726   |
|                   |           |                     | 82-98                                                                          | $\alpha/\beta$ -gliadina ( <i>T. urartu</i> ) Q41632                           |
| 0<br>(0-30)       | 21(11-33) | PQPQPFPLQPYPQPQS    | 79-95                                                                          | clon precursor $\alpha/\beta$ -gliadina PW8142 ( <i>T. aestivum</i> ) P04726   |
|                   |           |                     | 79-95                                                                          | $\alpha$ -gliadina ( <i>T. aestivum</i> ) Q41529                               |
|                   |           |                     | 79-95                                                                          | precursor $\alpha/\beta$ -gliadina ( <i>T. aestivum</i> ) Q41546               |

**Tabla 12. Homólogos de prolamina de A-gliadina 57-73 (con exclusión de alfa/beta-gliadinas)**

| Prolamina                  | Número de acceso   | Secuencia                        | % Bioactividad* |
|----------------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|
| Trigo: $\alpha$ -gliadina  | A-gliadina (57-73) | QLQPFQPQLPYPQPQS                 | 100 (0)         |
| Trigo: $\omega$ -gliadina  | AAG17702 (141-157) | PQ ..... F ..... QSE             | 32 (6,4)        |
| Cebada: C hordeína         | Q40055 (166-182)   | ... QPFPL ..... F ..... Q        | 2,3 (2,0)       |
| Trigo: $\gamma$ -gliadina  | P21292 (96-112)    | ... QTFPQ ..... F ..... QPQ      | 2,1 (4,2)       |
| Centeno: secalina          | Q43639 (335-351)   | ... QPSPQ ..... F ..... Q        | 1,6 (1,4)       |
| Cebada: $\gamma$ -hordeína | P80198 (52-68)     | ... QPFQP ..... HQHQFP           | -1,0 (1,8)      |
| Trigo: gluteninas de LMW   | P16315 (67-83)     | LQ ... QPIL ..... FS ... Q ... Q | -0,9 (1,0)      |
| Trigo: gluteninas de HMW   | P08489 (718-734)   | HGYPTS ..... SGQGQRP             | 6,4 (4,0)       |
| Trigo: $\gamma$ -gliadina  | P04730 (120-136)   | ... QCCQQL ..... I ... QQSRYP    | 0,7 (0,9)       |
| Trigo: gluteninas de LMW   | P10386 (183-199)   | ... QCCQQL ..... I ... QQSRYP    | -0,7 (0,5)      |
| Trigo: gluteninas de LMW   | 049958 (214-230)   | ... QCCRQL ..... I ... EQSRYP    | -1,1 (0,3)      |

| Prolamina           | Número de acceso | Secuencia                     | % Bioactividad* |
|---------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|
| Cebada: B1 hordeína | P06470 (176-192) | ... QCCQQL ..... I ... EQFRHE | 1,8 (1,4)       |
| Cebada: B hordeína  | Q40026 (176-192) | ... QCCQQL ..... ISEQFRHE     | 0,5 (0,9)       |

\* La bioactividad se expresa como 100x (puntos formadores de células con 25 µg/ml de péptido, más 8 µg/ml de tTG menos el blanco)/(puntos formadores de células con 25 µg/ml de A-gliadina 57-73, más 8 µg/ml de tTG menos el blanco) (media (SEM), n = 5).

5 Los péptidos se preincubaban con tTG durante 2 h a 37 °C. Nota, Q está desamidada en A-gliadina 57-73 por tTG.

**Tabla 13. Detalles clínicos de individuos celíacos.**

|     | HLA-DQ | Alelos HLA-DQA1 | Alelos HLA-DQB1 | Histología duodenal | Sin gluten | EMA en gluten (con DSG) |
|-----|--------|-----------------|-----------------|---------------------|------------|-------------------------|
| C01 | 2, 6   | 102/6, 501      | 201, 602        | AVS                 | 1 año      | + (-)                   |
| C02 | 2, 2   | 501             | 201             | AVS                 | 1 año      | + (-)                   |
| C03 | 2, 5   | 101/4/5, 501    | 201, 501        | AVP                 | 1 año      | + (-)                   |
| C04 | 2, 5   | 101/4-5, 501    | 201, 501        | AVS                 | 7 años     | + (-)                   |
| C05 | 2, 2   | 201, 501        | 201, 202        | AVS                 | 4 meses    | + (ND)                  |
| C06 | 2, 2   | 201, 501        | 201, 202        | AVS                 | 2 años     | + (-)                   |
| C07 | 2, 8   | 301-3, 501      | 201, 302        | AVS                 | 1 año      | + (-)                   |
| C08 | 2, 8   | 301-3, 501      | 201, 302/8      | AVS                 | 11 años    | ND (-)                  |
| C09 | 2, 8   | 301-3, 501      | 201, 302        | AVS                 | 29 años    | + (-)                   |
| C10 | 2, 8   | 201, 301-3      | 202, 302        | IEL                 | 1 año      | + (-)                   |
| C11 | 6, 8   | 102/6, 301-3    | 602/15, 302/8   | IEL                 | 9 meses    | - (ND)                  |
| C12 | 8, 7   | 301-3, 505      | 302, 301/9-10   | AVS                 | 2 años     | - (-)                   |
| C13 | 8, 8   | 301             | 302             | AVS                 | 1 año      | + (+)                   |

10

AVS: atrofia vellosa subtotal, AVP: atrofia vellosa parcial, IEL: atrofia intra-epitelial incrementada, DSG dieta sin gluten, ND: no determinado.

15 **Tabla 14. Respuestas ELISPOT para IFN-γ en HLA-DQ2+ celíaco (C01-6) y control sano (H01-10) a péptidos control (20 µg/ml) y gliadina (500 µg/ml) antes y después de la exposición a gluten (sfc/millón de PBMC menos respuesta a PBS solo)**

| Péptido            | Sano, Día 0 | Sano, Día 6 | Celíaco, Día 0 | Celíaco, Día 6         |
|--------------------|-------------|-------------|----------------|------------------------|
| P04722 77-93       | 0 (-4 a 17) | 0 (-5 a 9)  | -2 (-3 a 0)    | 27 (0-100)*            |
| P04722 77-93 + tTG | 0 (-5 a 4)  | 0 (-9 a 3)  | 0 (-4 a 11)    | <b>141 (8 a 290)**</b> |
| P04722 77-93 QE85  | 0 (-5 a 5)  | 0 (-3 a 4)  | 0 (-6 a 14)    | <b>133 (10 a 297)*</b> |
| P02863 77-93       | 0 (-4 a 13) | 2 (-3 a 5)  | -2 (-3 a 2)    | <b>8 (-2 a 42)**</b>   |

| Péptido                      | Sano, Día 0 | Sano, Día 6      | Celiaco, Día 0 | Celiaco, Día 6         |
|------------------------------|-------------|------------------|----------------|------------------------|
| P02863 77-93 + tTG           | -1 (-5 a 4) | -1 (-4 a 11)     | 1 (-4 a 6)     | <b>65 (8-164)**</b>    |
| P02863 77-93 QE85            | 0 (-4 a 13) | 0 (-4 a 14)      | -1 (-4 a 6)    | <b>42 (-2 a 176)*</b>  |
| Quimotripsina gliadina       | 2 (-5 a 20) | 18 (0 a 185)*    | 20 (11 a 145)  | 92 (50 a 154)          |
| Quimotripsina gliadina + tTG | 0 (-1 a 28) | 16 (-9 a 171)*   | 55 (29-248)    | <b>269 (206-384)**</b> |
| Quimotripsina                | 0 (-4 a 5)  | 1 (-4 a 11)      | -2 (-5 a 5)    | 1 (-4 a 8)             |
| Quimotripsina + tTG          | 0 (-5 a 8)  | 6 (0 a 29)       | -2 (-3 a 11)   | <b>2 (-3 a 18)*</b>    |
| Pepsina gliadina             | 4 (-4 a 28) | 29 (0 a 189)***  | 44 (10 a 221)  | <b>176 (54-265)**</b>  |
| Pepsina gliadina + tTG       | 2 (-3 a 80) | 27 (-4 a 241)*** | 61 (8 a 172)   | <b>280 (207-406)**</b> |
| Pepsina                      | 0 (-4 a 10) | 0 (-3 a 12)      | 0 (-2 a 3)     | 2 (-2 a 8)             |
| Pepsina + tTG                | 0 (-3 a 8)  | 0 (-5 a 9)       | 1 (-6 a 3)     | 0 (-3 a 14)            |
| PBS solo                     | 4 (0 a 6)   | 2 (0 a 6)        | 4 (1 a 12)     | 4 (0 a 4)              |
| PBS + tTG                    | 3 (0 a 8)   | 3 (0 a 11)       | 4 (2 a 10)     | 4 (2 a 11)             |

Día 6 Día vs 0: \*p <0,05 \*\*P <0,02, \*\*\*P <0,01 mediante un prueba de rangos con signo apareados de una cola de Wilcoxon

5

**Tabla 15. Efecto de desamidación por tTG de homólogos de la gliadina (0,5 mg/ml) y A-gliadina 57-73 sobre las respuestas ELISPOT para IFN-γ en individuos celíacos HLA-DQ2+ (C01-6) y de control sanos (H01-10) (relación de la mediana tTG:sin pretratamiento con tTG, intervalo)**

10

| Péptido                | Sano, Día 6    | Celiaco, Día 0 | Celiaco, Día 6    |
|------------------------|----------------|----------------|-------------------|
| Quimotripsina gliadina | 0,94 (0,4-9-0) | 2,1 (0,8-6,8)* | 3,2 (1,8 -4,2)**  |
| Pepsina gliadina       | 1,4 (0,5-1,4)  | 1,4 (0,8-4,0)* | 1,9 (1,1 a 4,4)** |
| P04722 77-93 Q85       |                |                | 6,5 (2,3 a 12)**  |
| P04722 77-93 E85       |                |                | 0,7 (0,6-1,1)     |
| P02863 77-93 Q85       |                |                | 7,5 (3,9-19,9)**  |
| P02863 77-93 E85       |                |                | 1,0 (0,8-1,2)     |

TTG> sin tTG: \*p <0,05 \*\* P <0,02,\*\*\* P <0,01 mediante un prueba de rangos con signo apareados de una cola de Wilcoxon

15

20

Tabla 16. Individuos sanos: respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  (> 10 sfc/millón de PBMC y > 4 sólo para tampón) a pools de péptidos de gliadina tratados con tTG el día 6 de la exposición al gluten (sfc/millón de PBMC) (en cursiva: respuesta también presente el día 0):

Grupo 1 – HLA-DQ2 (DQA1\*0501-5, DQB1\*0201)

5 Grupo 2 – HLA-DQ8 (DQA1\*0301, DQB1\*0302) y DQ2 ausente o "incompleto" (únicamente DQA1\*0501-5 o DQB1\*0201)

| Sujeto | Grupo 1 |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Grupo 2 |   |
|--------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------|---|
|        | H01     | H02  | H03  | H04  | H05  | H06  | H07  | H08  | H09  | H10  | H11     |   |
| HLA-DQ | 2, 6    | 2, 7 | 2, 8 | 2, 5 | 2, 6 | 2, 6 | 2, 6 | 2, 7 | 2, 5 | 2, 5 | 8, 8    |   |
| Pool 1 | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 2      | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 3      | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 4      | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | 13   | .    | .       | . |
| 5      | .       | 17   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | 24   | .    | .       | . |
| 6      | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | 31   | .    | .       | . |
| 7      | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 8      | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 9      | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 10     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 11     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 12     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 13     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 14     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 15     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 16     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 17     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 18     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | 20   | .    | .    | .    | .       | . |
| 19     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 20     | .       | 11   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 21     | .       | 11   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | 27   | .    | .       | . |
| 22     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 23     | .       | 43   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 24     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 25     | .       | 11   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 26     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 27     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 28     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 29     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 30     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | 23   | .    | .    | .       | . |
| 31     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 32     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 33     | .       | 20   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 34     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 35     | .       | 11   | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 36     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 37     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | 18   | .    | .    | .       | . |
| 38     | 14      | .    | .    | .    | .    | .    | .    | 12   | .    | .    | .       | . |
| 39     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | 11   | .    | .    | .       | . |
| 40     | .       | 14   | .    | .    | .    | .    | .    | 17   | .    | .    | .       | . |
| 41     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |
| 42     | .       | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .    | .       | . |

|                  |     |     |    |    |    |   |    |    |    |    |    |
|------------------|-----|-----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|
| 43               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | 11 | .  | .  |
| 44               | .   | 14  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 45               | .   | 11  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 46               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 47               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 48               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 49               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 50               | .   | 14  | .  | .  | 12 | . | .  | 22 | .  | 14 | .  |
| 51               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 52               | .   | 14  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 53               | .   | 26  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 54               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | 12 | .  | .  | .  |
| 55               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 56               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 57               | .   | 23  | .  | .  | .  | . | 12 | .  | .  | .  | .  |
| 58               | .   | 14  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 59               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 60               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 61               | .   | 23  | .  | .  | .  | . | .  | 11 | 11 | .  | .  |
| 62               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 63               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 64               | .   | 20  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 65               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 66               | .   | 14  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 67               | .   | 11  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 68               | .   | 20  | .  | .  | .  | . | .  | 20 | .  | .  | .  |
| 69               | .   | 20  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 70               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 71               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | 16 |
| 72               | .   | 11  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 73               | .   | 14  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 74               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 75               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 76               | .   | 14  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 77               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 78               | .   | 11  | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 79               | .   | 11  | .  | .  | 19 | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 80               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 81               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 82               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| 83               | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| P04722 77-93     | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| P04722 77-93 E   | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| P04722 77-93 E   | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| P02863 77-93     | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | 11 | .  | .  | .  |
| P02863 77-93 E   | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |
| Gliadina+C       | 171 | 40  | 25 | 16 | 10 | . | 18 | 14 | .  | 17 | 90 |
| Quimotripsina    | 29  | 26  | 18 | .  | .  | . | .  | 22 | .  | .  | .  |
| Gliadina+Pepsina | 241 | 151 | 29 | 24 | 48 | . | 16 | 45 | .  | 19 | 35 |
| Pepsina          | .   | .   | .  | .  | .  | . | .  | .  | .  | .  | .  |

**Tabla 17: Pools de péptidos de gliadina desamidados por tTG que muestran un aumento significativo en las respuestas de IFN- $\gamma$  entre los días 0 y 6 de la exposición a gluten en individuos C01-6 celíacos HLA-DQ2 (respuesta Día 6-Día 0, y la relación de respuestas al pool desamidado por tTG y el mismo pool sin tratamiento con tTG)**

5

| Pool | ELISpot para IFN $\gamma$<br>(Mediana sfc/millones) | tTG: sin tTG<br>(Mediana) | Pool | ELISpot para IFN $\gamma$<br>(Mediana sfc/millones) | tTG: sin tTG<br>(Mediana) |
|------|-----------------------------------------------------|---------------------------|------|-----------------------------------------------------|---------------------------|
| 9    | 59 ***                                              | 1,0                       | 49   | 46 ***                                              | 1,4                       |
| 10   | 116 **                                              | 1,7                       | 50   | 50 ***                                              | 4,6                       |
| 11   | 24 ***                                              | 2,5                       | 51   | 40 ***                                              | 1,7                       |
| 12   | 133 ***                                             | 1,1                       | 52   | 30 ***                                              | 3,1                       |
| 13   | 26 **                                               | 2,1                       | 53   | 27 **                                               | 1,4                       |
| 42   | 30 **                                               | 1,2                       | 76   | 17 ***                                              | 1,1                       |
| 43   | 32 ***                                              | 1,3                       | 79   | 20 ***                                              | 0,9                       |
| 44   | 24 ***                                              | 1,5                       | 80   | 83 ***                                              | 1                         |
| 45   | 10 ***                                              | 1,1                       | 81   | 141 ***                                             | 1,1                       |
| 46   | 12 ***                                              | 2,1                       | 82   | 22 ***                                              | 1,5                       |
| 48   | 17 ***                                              | 1,4                       | 83   | 16 **                                               | 1,8                       |

Día 6 vs Día 0 \*\*P <0,02, \*\*\*P <0,01 mediante un prueba de rangos con signo apareados de una cola de Wilcoxon

10



Tabla 18. Individuos celíacos: respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  > 10 sfc/millón de PBMC y > 4 sólo para tampón a pools de Pepset tratados con tTG el día 6 de la exposición al gluten (sfc/millón de PBMC) (en cursiva: respuesta también presente el día 0):

- 5 Grupo 1 - HLA-DQ2 (DQA1\*0501-5, DQB1\*0201/2),  
 Grupo 2 - HLA-DQ2/8 (DQA1\*0501-5, \*0301, y DQB1\*0201/2, \*0302) y  
 Grupo 3 - HLA-DQ8 (DQA1\*0301, DQB1\*0302) y DQ2 ausente o "incompleto" (únicamente DQA1\*0501-5 o DQB1\*0201/2)

| Sujeto | Grupo 1: |      |      |      |      |      | Grupo 2: |      |      | Grupo 3: |      |      |      |
|--------|----------|------|------|------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|------|
|        | C01      | C02  | C03  | C04  | C05  | C06  | C07      | C08  | C09  | C10      | C11  | C12  | C13  |
| HLA-DQ | 2, 6     | 2, 2 | 2, 5 | 2, 5 | 2, 2 | 2, 2 | 2, 8     | 2, 8 | 2, 8 | 2, 8     | 6, 8 | 7, 8 | 8, 8 |
| Pool 1 | .        | .    | .    | .    | .    | .    | 23       | .    | .    | .        | .    | 223  | .    |
| 2      | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | 155  | .    |
| 3      | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | 41   | .    |
| 4      | 11       | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | 22       | .    | .    | .    |
| 5      | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 6      | 18       | .    | .    | 21   | .    | .    | 20       | 17   | .    | .        | .    | .    | .    |
| 7      | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | 353  | .    | .        | .    | .    | .    |
| 8      | 11       | 64   | .    | .    | .    | 14   | 20       | 480  | .    | .        | .    | .    | 13   |
| 9      | 93       | 127  | .    | 92   | 25   | .    | 32       | 460  | .    | .        | .    | .    | 18   |
| 10     | 175      | 491  | 58   | 200  | 48   | .    | 84       | 787  | .    | .        | .    | .    | .    |
| 11     | 32       | 118  | .    | 33   | 14   | .    | 26       | 27   | .    | 12       | .    | .    | .    |
| 12     | 204      | 379  | 54   | 225  | 61   | .    | 129      | 587  | .    | 12       | .    | .    | .    |
| 13     | 93       | 142  | .    | 29   | 18   | .    | .        | 60   | .    | .        | .    | .    | 11   |
| 14     | .        | 45   | .    | 21   | .    | .    | 17       | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 15     | 18       | 30   | .    | .    | .    | .    | 38       | 43   | .    | .        | .    | .    | .    |
| 16     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | 37   | .    | .        | .    | .    | .    |
| 17     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 18     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 19     | 11       | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 20     | 11       | 215  | .    | .    | .    | .    | 51       | 167  | .    | .        | .    | .    | .    |
| 21     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | 11   | .        | .    | .    | .    |
| 22     | .        | 21   | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 23     | .        | 18   | .    | 21   | .    | .    | .        | .    | .    | 12       | .    | .    | .    |
| 24     | .        | 15   | .    | .    | .    | .    | .        | 10   | .    | .        | .    | .    | .    |
| 25     | .        | 15   | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | 12       | .    | .    | .    |
| 26     | .        | 18   | .    | .    | .    | .    | .        | 13   | .    | 12       | .    | .    | .    |
| 27     | .        | 15   | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 28     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | 11   |
| 29     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | 11       | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 30     | 11       | .    | .    | .    | .    | .    | 11       | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 31     | .        | 70   | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 32     | .        | 18   | .    | .    | .    | .    | 20       | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 33     | 11       | .    | .    | 10   | .    | .    | 14       | .    | 11   | .        | 40   | .    | 11   |
| 34     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | 11   | .        | .    | .    | .    |
| 35     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 36     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 37     | .        | .    | .    | 23   | .    | 14   | .        | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 38     | .        | 24   | .    | 19   | .    | .    | 20       | .    | .    | .        | .    | .    | .    |
| 39     | .        | 49   | .    | 15   | .    | .    | .        | .    | 11   | .        | .    | .    | .    |
| 40     | .        | .    | .    | .    | .    | .    | 14       | .    | .    | .        | .    | .    | .    |

|     |     |           |
|-----|-----|-----------|
| 11  | 63  |           |
| 190 | 113 |           |
| 87  | 107 |           |
| 38  | 110 |           |
| 63  | 163 |           |
| 223 | 97  |           |
| 144 | 353 |           |
| 202 | 293 |           |
| 248 | 143 |           |
| 220 | 267 |           |
| 175 | 180 |           |
| 69  | 53  |           |
| 166 | 27  |           |
|     |     | <i>II</i> |
| 20  | 13  |           |
|     | 53  |           |
| 11  | 53  |           |
| 20  |     |           |
| 60  |     |           |
|     |     |           |
| 35  | 27  |           |
| 17  |     |           |
| 17  |     |           |
|     |     |           |
| 20  | 20  |           |
|     |     |           |
| 14  |     |           |
|     |     |           |
| 11  |     |           |
| 254 | 447 |           |
|     |     |           |
|     | 13  |           |
|     |     |           |
| 44  | 43  |           |
| 208 | 467 |           |
| 211 | 530 |           |
| 241 | 723 |           |
| 163 | 277 |           |
| 78  | 740 |           |
| 84  | 653 |           |
| 63  | 500 |           |
| 29  | 603 |           |
| 23  | 520 |           |
| 278 | 543 | 17        |
|     |     |           |
| 357 | 557 |           |

|    |    |     |    |
|----|----|-----|----|
| 12 |    |     |    |
|    |    | 21  |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    | 31  |    |
|    |    | 57  |    |
|    |    | 39  |    |
|    |    |     | 11 |
|    |    | 29  |    |
|    |    |     |    |
|    |    | 19  | 13 |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
| 28 |    |     |    |
| 18 |    |     |    |
|    | 11 |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    | 18 |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    | 12  |    |
|    |    |     |    |
| 12 |    | 70  |    |
|    |    | 74  |    |
|    |    |     |    |
| 15 |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    |    |     |    |
|    | 25 | 527 | 71 |
| 42 | 89 | 335 | 87 |

**Tabla 19: Péptidos desamidados con bioactividad media > 10% de P04722 E85 (20 µg/ml) en individuos celíacos C01-5 HLA-DQ2**

| Clasificación | Número | Secuencia                                                                                             | Media<br>(SEM) | Clasificación | Número | Secuencia                                                                                                                    | Media<br>(SEM) |
|---------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|               | 89     | PQLPYFQQLPYFQQLPYF                                                                                    | 94 (18)        | 37            | 413    | SKQ <sup>2</sup> QQ <sup>2</sup> FFQ <sup>2</sup> QQ <sup>2</sup> QQ <sup>2</sup> SPQ                                        | 13 (4)         |
| *2            | 91     | PQFFPQLFYFQQLPYFQ                                                                                     | 89 (12)        | 38            | 330    | QPQQPQQPFPQ <sup>2</sup> QQ <sup>2</sup> QLFFP                                                                               | 13 (6)         |
| *3            | 74     | MLQQLFFQQLPYFQQLPY                                                                                    | 88 (14)        | 39            | 618    | PQQSFSYQQQPFQ <sup>2</sup> QPYPQQ                                                                                            | 13 (7)         |
| *4            | 90     | PQLPYFQQLPYFQQLFFR                                                                                    | 87 (16)        | *40           | 78     | LQLQFFRPQLFYFQQLFFR                                                                                                          | 17 (8)         |
| *5            | 76     | LQLQFFRPQLFYFQQLFFR                                                                                   | 85 (15)        | 41            | 390    | QQTYFQRPQQLFYFQQLFFR                                                                                                         | 17 (9)         |
| 6             | 626    | PQQPQQPQQPFPQ <sup>2</sup> QFFP <sup>2</sup> W                                                        | 72 (23)        | 42            | 346    | QQTFPQQQ <sup>2</sup> TFPQ <sup>2</sup> QQQ <sup>2</sup> FP                                                                  | 16 (10)        |
| 7             | 627    | QFFPQQPQQPFPQ <sup>2</sup> QFFQ                                                                       | 66 (30)        | 43            | 409    | QPQQPQLQQPQQP <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q                                                                                  | 15 (2)         |
| *8            | 631    | FPQQPQQPFPQQLFFPQQS                                                                                   | 61 (12)        | 44            | 332    | QQPFPQQPQQPFFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q                                                                  | 15 (6)         |
| 9             | 636    | PQQPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPVQ <sup>2</sup> Q                                            | 51 (10)        | 45            | 629    | FPFQTQQSFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q                                                     | 15 (5)         |
| *10           | 73     | LQLQFFPQQLFYFQQLPY                                                                                    | 49 (11)        | 46            | 643    | P <sup>2</sup> LQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q | 15 (6)         |
| 11            | 412    | SQQPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q                | 34 (19)        | 47            | 339    | QQPFPQTQQPQQPFFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q                                                                               | 15 (6)         |
| 12            | 342    | QQPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q                 | 34 (11)        | 48            | 350    | QQTFPQQ <sup>2</sup> TFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP                                                      | 15 (8)         |
| *12           | 68     | LQLQFFPQQLFYFQQLFFR                                                                                   | 33 (10)        | 49            | 65     | FPFSQQPYFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP                                      | 15 (5)         |
| *14           | 66     | LQLQFFPQQLFYFQQLFFR                                                                                   | 32 (7)         | 50            | 349    | QQPFPQQ <sup>2</sup> TFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP                                                      | 15 (9)         |
| *15           | 96     | PQFFPQLFYFQQLFFPQQ                                                                                    | 28 (6)         | 51            | 610    | PWQQQLPQQSQSRSQQPFS                                                                                                          | 15 (11)        |
| 16            | 392    | QLPFPQQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q | 27 (8)         | *52           | 81     | PQFPFPQQLFYFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> FP                                                                 | 15 (5)         |
| 17            | 355    | QAFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                  | 27 (15)        | *53           | 75     | MLQ <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                         | 14 (5)         |
| *18           | 67     | LQLQFFPQQLFYFQQLFFR                                                                                   | 26 (6)         | 54            | 358    | QQFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q                           | 14 (7)         |
| 19            | 335    | QQQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q   | 25 (11)        | *55           | 82     | PQFPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                                       | 14 (3)         |
| *20           | 95     | PQFFLPQLFYFQQLFFPQQ                                                                                   | 24 (6)         | *56           | 80     | LQLQFFPQQLFFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                                                                 | 14 (4)         |
| 21            | 396    | TQQPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                             | 23 (9)         | 57            | 624    | FTQPQQ <sup>2</sup> TFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                                     | 14 (6)         |
| 22            | 609    | SCISGLRPWQQQLFFPQQS                                                                                   | 23 (18)        | 58            | 407    | QPQQPFPQSQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                                    | 14 (5)         |
| 23            | 385    | QQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q  | 23 (7)         | 59            | 337    | QQQ <sup>2</sup> FPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                          | 13 (4)         |
| 24            | 375    | PQFPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q | 23 (10)        | 60            | 634    | PQQLQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                       | 13 (3)         |
| 25            | 406    | QPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                               | 22 (8)         | 61            | 383    | QQFYFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                         | 13 (3)         |
| 26            | 625    | PIQPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                             | 22 (9)         | 62            | 641    | FPFLQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                       | 13 (7)         |
| 27            | 378    | QQPQQ <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                | 22 (10)        | 63            | 399    | QQPFPQTQQPQQPFPQLQQP                                                                                                         | 13 (5)         |
| 28            | 371    | PQQQFPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q               | 22 (10)        | 64            | 387    | QQTFPQQQLFFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                                                                  | 13 (4)         |
| 29            | 642    | PQQPQQPFPQLPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                         | 20 (8)         | 65            | 628    | FPFWQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                       | 12 (4)         |
| 30            | 635    | PLQPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                             | 19 (5)         | *66           | 88     | PQFFFPQLFYFQQLFFPQQ                                                                                                          | 12 (3)         |
| *31           | 93     | PQFPFPQLFYFQQLFFPQQ                                                                                   | 19 (5)         | 67            | 408    | QPQQPFPQSKQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                                                  | 12 (3)         |
| 32            | 377    | PQQQFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q | 19 (9)         | *68           | 77     | LQLQFFPQQLFFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                                                                 | 11 (4)         |
| 33            | 411    | LQQPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                             | 19 (4)         | 69            | 370    | PQQQFLPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                                      | 11 (5)         |
| 34            | 415    | SQQPQQPFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                             | 18 (5)         | *70           | 79     | LQLQFFPQQLFFPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                                                                 | 11 (5)         |
| *35           | 94     | PQFPFPQLFYFQQLFFPQQ                                                                                   | 18 (3)         | 71            | 379    | QQPQQ <sup>2</sup> FPQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                        | 11 (5)         |
| 36            | 329    | PEGVQWQQQ <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FP <sup>2</sup> Q                             | 18 (4)         | 72            | 397    | QQPQQ <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> Q <sup>2</sup> FPFQ <sup>2</sup> Q                                       | 11 (5)         |

\*Indica un homólogo de A-gliadina 57-73 con la secuencia central PQLP(Y/F)

Tabla 20: Péptidos &gt; 10% tan bioactivos como P04722 QE65 agrupados por estructura

| Clasificación                                 | Péptido número<br>(pool)<br>subtipo de gliadina | Secuencia                | Respuesta ELISPOT<br>para IFN- $\gamma$<br>comparada con<br>P04722 77-93<br>QE85: Media<br>(SEM) |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Grupo 1: Homólogos de A-gliadina 57-73</b> |                                                 |                          |                                                                                                  |
|                                               | <b>P04722 77-93</b>                             | <b>QLQPEFPQLPYQPQP</b>   |                                                                                                  |
| 1                                             | 89 (12) $\alpha$                                | PQL...Y.....LPYP         | 94 (18)                                                                                          |
| 2                                             | 91 (12) $\alpha$                                | POPFPQL...Y.....         | 89 (12)                                                                                          |
| 3                                             | 74 (10) $\alpha$                                | M.....LPY                | 88 (14)                                                                                          |
| 4                                             | 90 (12) $\alpha$                                | PQL...Y.....PFRP         | 87 (16)                                                                                          |
| 5                                             | 76 (10) $\alpha$                                | L.....PFR                | 85 (15)                                                                                          |
| 8                                             | 631 (81) $\omega$                               | FPQQPQ.....F.....QS      | 61 (12)                                                                                          |
| 10                                            | 73 (10) $\alpha$                                | L.....LPY                | 49 (11)                                                                                          |
| 13                                            | 68 (9) $\alpha$                                 | L.....L.....PFR          | 33 (10)                                                                                          |
| 14                                            | 66 (9) $\alpha$                                 | L.....S.....PFR          | 32 (7)                                                                                           |
| 18                                            | 57 (9) $\alpha$                                 | L.....S.....QFR          | 26 (6)                                                                                           |
| 20                                            | 95 (13) $\alpha$                                | PQFFL.....FPQQ           | 24 (6)                                                                                           |
| 31                                            | 93 (12) $\alpha$                                | PQFPF.....PFRPQQ         | 19 (5)                                                                                           |
| 35                                            | 94 (12) $\alpha$                                | PQFPF.....PPFSPOQ        | 18 (3)                                                                                           |
| 40                                            | 78 (10) $\alpha$                                | L.....R.....PFR          | 17 (8)                                                                                           |
| 52                                            | 81 (11) $\alpha$                                | PQFPFP.....T...PFPF      | 15 (5)                                                                                           |
| 53                                            | 75 (10) $\alpha$                                | MLQFPFPQFPF.....         | 14 (5)                                                                                           |
| 55                                            | 82 (11) $\alpha$                                | PQFPFPQFPF.....          | 14 (3)                                                                                           |
| 56                                            | 80 (10) $\alpha$                                | LQLQFPFPQFPF.....        | 14 (4)                                                                                           |
| 66                                            | 88 (11) $\alpha$                                | PQFPF.....S.....PFRPQQ   | 12 (3)                                                                                           |
| 68                                            | 77 (10) $\alpha$                                | LQLQFPFPQFPF.....        | 11 (4)                                                                                           |
| 70                                            | 79 (10) $\alpha$                                | LQLQFPFPQFPFL.....       | 11 (5)                                                                                           |
| <b>Grupo 2: Homólogos del péptido 626</b>     |                                                 |                          |                                                                                                  |
|                                               |                                                 | <b>QQPEFPQFPFP</b>       |                                                                                                  |
| 6                                             | 626(80) $\omega$                                | PQQPQQP.....W            | 72 (23)                                                                                          |
| 7                                             | 627(80) $\omega$                                | .....WQPPQFPQ            | 66 (30)                                                                                          |
| 9                                             | 636(81) $\omega$                                | PQQP.....I...VQPQ        | 51 (10)                                                                                          |
| 11                                            | 412(53) $\gamma$                                | SQQP.....Q.....PQQ       | 34 (19)                                                                                          |
| 33                                            | 411(53) $\gamma$                                | LQQP.....Q.....PQQ       | 19 (4)                                                                                           |
| 36                                            | 329(42) $\gamma$                                | PSGQVQWPQ.....           | 18 (4)                                                                                           |
| 41                                            | 390(50) $\gamma$                                | QQTYPQP.....T.....QQ     | 17 (9)                                                                                           |
| 59                                            | 337(43) $\gamma$                                | Q.....CQQPQRTI           | 13 (4)                                                                                           |
| 61                                            | 388(50) $\gamma$                                | QQYPQQP.....T.....QQ     | 13 (3)                                                                                           |
| <b>Grupo 3: Homólogos del péptido 355</b>     |                                                 |                          |                                                                                                  |
|                                               |                                                 | <b>EPQPQQTFPHQPQQFP</b>  |                                                                                                  |
| 17                                            | 355(46) $\gamma$                                | QA.....Q                 | 27 (15)                                                                                          |
| 42                                            | 348(45) $\gamma$                                | QQT.....                 | 16 (10)                                                                                          |
| 48                                            | 350(45) $\gamma$                                | QQL.....A.....           | 15 (8)                                                                                           |
| 50                                            | 349(45) $\gamma$                                | QQL.....                 | 15 (9)                                                                                           |
| <b>Grupo 4: Homólogos del péptido 396</b>     |                                                 |                          |                                                                                                  |
|                                               |                                                 | <b>QQFPFPQQPQQFP</b>     |                                                                                                  |
| 21                                            | 396(51) $\gamma$                                | TQQP.....QTQ             | 23 (9)                                                                                           |
| 27                                            | 378(49) $\gamma$                                | QQP.....QPQQ             | 22 (10)                                                                                          |
| 28                                            | 371(48) $\gamma$                                | PQQQFIQP.....TY          | 22 (10)                                                                                          |
| 29                                            | 642(82) $\omega$                                | PQQP.....L.....QQP       | 20 (8)                                                                                           |
| 30                                            | 635(81) $\omega$                                | PLQP.....QPQ             | 19 (5)                                                                                           |
| 44                                            | 382(49) $\gamma$                                | .....QTQQPQQ             | 16 (6)                                                                                           |
| 45                                            | 629(81) $\omega$                                | PFPQT.....S.....L.....QQ | 16 (5)                                                                                           |
| 46                                            | 643(82) $\omega$                                | PLQP.....QQP             | 16 (6)                                                                                           |
| 60                                            | 634(81) $\omega$                                | PQQL.....L.....QQP       | 13 (3)                                                                                           |
| 64                                            | 387(50) $\gamma$                                | .....T.....L.....QQPQQPF | 13 (4)                                                                                           |
| 62                                            | 641(82) $\omega$                                | FPFL.....L.....LQP       | 13 (7)                                                                                           |

| Grupo 5: Homólogos del péptido 343 (solapado de los grupos 2 y 4) |           |                           |         |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------|---------|
|                                                                   |           | QQPFPQPQQPQLPFPQ          |         |
| 12                                                                | 343(44) γ | QQP.....Q                 | 34 (11) |
| 16                                                                | 393(51) γ | QLPFPQQP.....             | 27 (8)  |
| 19                                                                | 335(43) γ | QQ.....Q.....PQ           | 25 (11) |
| 23                                                                | 385(50) γ | .....QPQQ                 | 23 (7)  |
| 24                                                                | 375(48) γ | P.....Q.....PQQ           | 23 (10) |
| 25                                                                | 406(52) γ | QP.....L.....Q.....PQ     | 22 (8)  |
| 32                                                                | 377(49) γ | P.....Q.....Q.....QPQ     | 19 (9)  |
| 34                                                                | 415(53) γ | SQQP.....QS.....          | 18 (5)  |
| 37                                                                | 413(53) γ | SKQP.....QS.....          | 18 (4)  |
| 38                                                                | 380(49) γ | QPQQP.....                | 18 (6)  |
| 43                                                                | 409(53) γ | QP.....L.....Q...L.....PQ | 16 (2)  |
| 47                                                                | 389(50) γ | .....T.....Q.....QPQQ     | 16 (6)  |
| 58                                                                | 407(52) γ | QP.....S.....Q.....PQ     | 14 (5)  |
| 63                                                                | 399(51) γ | .....T.....Q.....LQQP     | 13 (5)  |
| 67                                                                | 408(52) γ | QP.....SK.....Q.....PQ    | 12 (5)  |
| 71                                                                | 379(49) γ | QQP.....Q.....Q.....P     | 11 (5)  |
| 72                                                                | 397(51) γ | PQQP.....T.....Q.....     | 11 (3)  |
| Grupo 6: Péptido 625                                              |           |                           |         |
|                                                                   |           | PIQPQQPFPQQP              |         |
| 26                                                                | 625(80) ω | .....QQPQQPFP             | 22 (9)  |
| 57                                                                | 624(80) ω | FTQPQQPT.....             | 14 (6)  |
| 65                                                                | 628(80) ω | PF...W.....TQQSFPLQ       | 12 (4)  |
| Grupo 7: Péptido 618                                              |           |                           |         |
| 39                                                                | 618(79) ω | PQQSFYQQQFPQQPYQQ         | 18 (7)  |

Tabla 21. Bioactividad de pools de péptidos 1-3 individuales desamidados con tTG en el individuo C12

| Número                                                                                             | Secuencia             | %   | Número | Secuencia                   | %  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----|--------|-----------------------------|----|
| 8                                                                                                  | AVRWVPVQLOPONPSQQQOPQ | 100 | 23     | <u>LQPQNPSQQQ</u> QEQVPLMQQ | 26 |
|                                                                                                    |                       | 85  |        |                             | 18 |
| 5                                                                                                  | MVRVTVFQ.....         | 14  |        | .....EQVPLVQQ               | 18 |
|                                                                                                    |                       | 82  |        |                             | 18 |
| 6                                                                                                  | AVRVSVFQ.....         | 15  |        | .....H.....EQVPLVQQ         | 18 |
|                                                                                                    |                       | 77  |        |                             | 18 |
| 3                                                                                                  | MVRVPVQ.....H.....    | 17  |        | .....KQVPLVQQ               | 13 |
|                                                                                                    |                       | 67  |        |                             | 13 |
| 1                                                                                                  | AVRFVPVQ.....L.....   | 16  |        | .....D.....EQVPLVQQ         | 8  |
|                                                                                                    |                       | 59  |        |                             | 8  |
| 2                                                                                                  | MVRVPVQ.....          | 13  |        | .....EQVPLVQQ               | 5  |
|                                                                                                    |                       | 49  |        |                             | 5  |
| 9                                                                                                  | AVRVVPVQ.....L.....   | 22  |        | .....K.....EQVPLVQQ         | 3  |
|                                                                                                    |                       | 49  |        |                             | 3  |
| 7                                                                                                  | AVRVVPVQ.....         | 18  |        | .....L.....EQVPLVQE         | 3  |
|                                                                                                    |                       | 33  |        |                             | 3  |
| 10                                                                                                 | MVRVPVQ.....L.....    | 19  |        | .....L.....EQVPLVQE         |    |
| 4                                                                                                  | MVRVPMPQ.....D.....   | 15  | 20     | P.....P.....GQVPLVQQ        | 0  |
| 12                                                                                                 | AVRVVPVQ.....K.....   | 8   | 21     | P.....P.....RQVPLVQQ        | 0  |
| 11                                                                                                 | AVRVVPVQP.....P.....  | 0   |        |                             |    |
| La secuencia central del epítipo está subrayada. La secuencia desamidada predicha es: LQPENPSQEQPE |                       |     |        |                             |    |

Tabla 22: Agrupaciones filogenéticas de gliadinas del trigo (*Triticum aestivum*)

|       | Alfa/beta-gliadinas (n=61)                                                 |        |                                            |
|-------|----------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------|
| A1a1  | AAA96525, EEWTA, P02863                                                    | A1b13  | B22364, P04271                             |
| A1a2  | CAB76963                                                                   | A2a1   | AAB23109, CAA35238, P18573, S10015         |
| A1a3  | AAA96276                                                                   | A2a2   | CAB76964                                   |
| A1a4  | CAA26384, S07923                                                           | A2b1   | P04724, T06500, AAA348282                  |
| A1a5  | AAA34280                                                                   | A2b2   | D22364                                     |
| A1a6  | P04728                                                                     | A2b3   | P04722, T06498, AAA34276                   |
| A1b1  | CAB76962                                                                   | A2b4   | C22364                                     |
| A1b2  | CAB76961                                                                   | A2b5   | CAB76956                                   |
| A1b3  | BAA12318                                                                   | A3a1   | AAA34277, CAA26383, P04726, S07361         |
| A1b4  | CAB76960                                                                   | A3a2   | 1307187B, A27319, S13333                   |
| A1b5  | CAB76958                                                                   | A3b1   | AAA96522                                   |
| A1b6  | CAB76959                                                                   | A3b2i  | AAA34279, P04727,                          |
| A1b7  | CAB76955                                                                   | A3b2ii | CAA26385, S07924                           |
| A1b8  | AAA96524                                                                   | A3b3   | A22364, AAA34278, AAB23108, C61218, P04725 |
| A1b9  | CAA10257                                                                   | A4a    | P04723, AAA34283, T06504                   |
| A1b10 | AAA96523, T06282                                                           | A4b    | E22364                                     |
| A1b11 | AAA17741, S52124                                                           | A4c    | CAB76957                                   |
| A1b12 | AAA34281                                                                   | A4d    | CAB76954                                   |
|       | Gamma-gliadinas (n=47)                                                     |        | Gamma-gliadinas                            |
| GI1a  | P08079, AAA34288, PS0094, CAC11079, AAD30556, CAC11057, CAC11065, CAC11056 | GI5a   | AAK84774, AAK84772                         |
| GI1b  | CAC11089, CAC11064, CAC11080, CAC11078, AAD30440                           | GI5b   | AAK84773                                   |
| GI1c  | CAC11087                                                                   | GI5c   | AAK84776                                   |
| GI1d  | CAC11088                                                                   | GI6a   | JA0153, P21292, AAA34272, 1507333A         |
| GI1e  | CAC11055                                                                   | GI6b   | AAK84777                                   |

|      |                                   |        |                              |
|------|-----------------------------------|--------|------------------------------|
|      | <b>Alfa/beta-gliadinas (n=61)</b> |        |                              |
| GI2a | JS0402, P08453, AAA34289          | GI6c   | 1802407A, AAK84775, AAK84780 |
| GI2b | AAF42989, AAK84779, AAK84779      | GI7    | AAB31090                     |
| GI3a | AAK84778                          | GIIa   | AAA34287, P04730, S07398     |
| GI3b | CAB75404                          | GIIb   | 1209306A                     |
| GI3c | BAA11251                          | GIII1a | P04729                       |
| GI4  | EEWTG, P06659, AAA34274           | GIII1b | AAA34286                     |
|      | <b>Omega-gliadinas (n=3)</b>      |        |                              |
| O1a  | AAG17702                          |        |                              |
| O1b  | P02865                            |        |                              |
| O1c  | A59156                            |        |                              |



Tabla 23. Péptidos sintéticos que abarcan todos los 12-mer de gliadina del trigo conocidos

| Proteína      | Posición | Secuencia                | Número | Proteína       | Posición       | Secuencia                | Número |
|---------------|----------|--------------------------|--------|----------------|----------------|--------------------------|--------|
| <b>POOL 1</b> |          |                          |        | <b>POOL 43</b> |                |                          |        |
| A1A1          | 20       | AVRF PVPQ LQPQ NPSQ QLPQ |        | 1              | G12A 33        | QQQL VPQL QQFL SQQP QQTF | 331    |
| A1A2          | 20       | MVRV PVPQ LQPQ NPSQ QQPQ |        | 2              | G13A 33        | QQQP FPQP HQPF SQQP QQTF | 332    |
| A1B1          | 20       | MVRV PVPQ LQPQ NPSQ QHPQ |        | 3              | G14 33         | QQQP FLQP HQPF SQQP QQIF | 333    |
| A1B2          | 20       | MVRV PMPQ LQPQ DPSQ QQPQ |        | 4              | G15A 33        | QQQQ PFPQ PQQP FSQQ PQQI | 334    |
| A1B7          | 20       | MVRV TVPQ LQPQ NPSQ QQPQ |        | 5              | G15B 33        | QQQQ PFPQ PQQP QQPF PQPQ | 335    |
| A1B8          | 20       | AVRV SVPQ LQPQ NPSQ QQPQ |        | 6              | G15C 33        | QQQP FRQP QQPF YQQP QHTF | 336    |
| A1B8          | 20       | AVRV PVPQ LQPQ NPSQ QQPQ |        | 7              | G16A 33        | QQQP FPQP QQPF CQQP QRTI | 337    |
| A1B10         | 20       | AVRW PVPQ LQPQ NPSQ QQPQ |        | 8              | G16C 42        | QQQP FPQP QQPF CEQP QRTI | 338    |
| <b>POOL 2</b> |          |                          |        | <b>POOL 44</b> |                |                          |        |
| A2B3          | 20       | AVRV PVPQ LQLQ NPSQ QQPQ |        | 9              | G11A 42        | HQPF SQQP QQTF PQPQ QTFF | 339    |
| A2B5          | 20       | MVRV PVPQ LQLQ NPSQ QQPQ |        | 10             | G12A 42        | QQPL SQQP QQTF PQPQ QTFF | 340    |
| A2A1          | 20       | AVRV PVPQ PQPQ NPSQ PQPQ |        | 11             | G14 42         | HQPF SQQP QQIF PQPQ QTFF | 341    |
| A3B1          | 20       | AVRV PVPQ LQPK NPSQ QQPQ |        | 12             | G15A 42        | QQPF SQQP QQIF PQPQ QTFF | 342    |
| A1A1          | 28       | LQPQ NPSQ QLPQ EQVP LVQQ |        | 13             | G15B 42        | QQPQ QPFP QPQQ PQLP FFPQ | 343    |
| A1A2          | 28       | LQPQ NPSQ QQPQ EQVP LVQQ |        | 14             | G15C 42        | QQPF YQQP QHTF PQPQ QTCP | 344    |
| A1B1          | 28       | LQPQ NPSQ QHPQ EQVP LVQQ |        | 15             | G16A 42        | QQPF CQQP QRTI PQPH QTFF | 345    |
| A1B2          | 28       | LQPQ DPSQ QQPQ EQVP LVQQ |        | 16             | G16B 42        | QQPF CQQP QQTI PQPH QTFF | 346    |
| <b>POOL 3</b> |          |                          |        | <b>POOL 45</b> |                |                          |        |
| A2B1          | 28       | LQPQ NPSQ QQPQ KQVP LVQQ |        | 17             | G16C 42        | QQPF CEQP QRTI PQPH QTFF | 347    |
| A2B3          | 28       | LQLQ NPSQ QQPQ EQVP LVQE |        | 18             | G11A 50        | QQTF PQPQ QTFF HQPQ QQPF | 348    |
| A2B5          | 28       | LQLQ NPSQ QQPQ EQVP LVQE |        | 19             | G14 50         | QQIF PQPQ QTFF HQPQ QQPF | 349    |
| A3A1          | 28       | PQPQ NPSQ PQPQ GQVP LVQQ |        | 20             | G15A 50        | QQIF PQPQ QTFF HQPQ QAFP | 350    |
| A3A2          | 28       | PQPQ NPSQ PQPQ RQVP LVQQ |        | 21             | G16A 50        | QRTI PQPH QTFF HQPQ QTFF | 351    |
| A3B1          | 28       | LQPK NPSQ QQPQ EQVP LVQQ |        | 22             | G15A 58        | QTFF HQPQ QAFP PQPQ TFFH | 352    |
| A4A           | 28       | LQPQ NPSQ QQPQ EQVP LMQQ |        | 23             | G16A 58        | QTFF HQPQ QTFF PQPQ TYPH | 353    |
| A1A1          | 36       | QIPQ EQVP LVQQ QQFL GQQQ |        | 24             | G16C 58        | QTFF HQPQ QTFF QPEQ TYPH | 354    |
| <b>POOL 4</b> |          |                          |        | <b>POOL 46</b> |                |                          |        |
| A1B1          | 36       | QHPQ EQVP LVQQ QQFL GQQQ |        | 25             | G15A 66        | QAFP PQPQ TFFH PQPQ QFPQ | 355    |
| A1B2          | 36       | QQPQ EQVP LVQQ QQFL GQQQ |        | 26             | G15C 66        | QHTF PQPQ QTCP HQPQ QQPF | 356    |
| A1B12         | 36       | QQPQ EQVP LVQQ QQFL GQQQ |        | 27             | G16A 66        | QTFF PQPQ TYPH PQPQ QFPQ | 357    |
| A2A1          | 36       | QQPQ EQVP LVQQ QQFP GQQQ |        | 28             | G16C 66        | QTFF PQPQ TYPH PQPQ QFPQ | 358    |
| A2B1          | 36       | QQPQ KQVP LVQQ QQFP GQQQ |        | 29             | G11A 73        | QTFF HQPQ QQPF PQPQ PQPQ | 359    |
| A2B3          | 36       | QQPQ EQVP LVQE QQFP GQQQ |        | 30             | G12A 73        | QTFF PQPQ QQVP PQPQ PQPQ | 360    |
| A3A1          | 36       | PQPQ GQVP LVQQ QQFP GQQQ |        | 31             | G13A 73        | QTFF PQPQ QQFS PQPQ PQPQ | 361    |
| A3A2          | 36       | PQPQ RQVP LVQQ QQFP GQQQ |        | 32             | G15C 73        | QTCP HQPQ QQPF PQPQ PQPQ | 362    |
| <b>POOL 5</b> |          |                          |        | <b>POOL 47</b> |                |                          |        |
| A4A           | 36       | QQPQ EQVP LMQQ QQFP PGQQ |        | 33             | G16A 73        | QTFP HQPQ QQPF QTQQ PQPQ | 363    |
| A1A1          | 44       | LVQQ QQFL GQQQ FFPF QPQY |        | 34             | G11A 81        | QQFP PQPQ PQPQ FLQP QQPF | 364    |
| A1B1          | 44       | LVQQ QQFL GQQQ SFPP QPQY |        | 35             | G12A 81        | QQVP PQPQ PQPQ FLQP QQPF | 365    |
| A1B12         | 44       | LVQQ QQFL GQQQ FFPF QPQY |        | 36             | G13A 81        | QQFS PQPQ PQPQ FQPF QQPF | 366    |
| A2A1          | 44       | LVQQ QQFP GQQQ FFPF QPQY |        | 37             | G14 81         | QQFP PQPQ PQPQ FLQP RQPF | 367    |
| A2B3          | 44       | LVQE QQFP GQQQ FFPF QPQY |        | 38             | G15A 81        | QQFP PQPQ PQPQ FFPQ PQPQ | 368    |
| A3A1          | 44       | LVQQ QQFP GQQQ QQFP QPQY |        | 39             | G16A 81        | QQFP QTQQ PQPQ FFPQ QTTF | 369    |
| A4A           | 44       | LMQQ QQFP PGQQ EQFP PQPQ |        | 40             | G11A 89        | PQPQ FLQP QQPF PQPQ QPQY | 370    |
| <b>POOL 6</b> |          |                          |        | <b>POOL 48</b> |                |                          |        |
| A4D           | 44       | LMQQ QQFP PGQQ ERFP PQPQ |        | 41             | G13A 89        | PQPQ FQPF QQPF PQPQ QQTY | 371    |
| A1A1          | 53       | GQQQ FFPF QPQY PQPQ PFPF |        | 42             | G13B 89        | PQPQ FQPF QQPF QTYP QRPF | 372    |
| A1A3          | 53       | GQQQ FFPF QPQY PQPQ PFPF |        | 43             | G14 89         | PQPQ FLQP RQPF PQPQ QPQY | 373    |
| A1B1          | 53       | GQQQ SFPP QPQY PQPQ PFPF |        | 44             | G15A 89        | PQPQ FFPQ PQPQ FFPQ QPQY | 374    |
| A2B1          | 53       | GQQQ FFPF QPQY PQPQ PFPF |        | 45             | G15C 89        | PQPQ FFPQ PQPQ QPFP PQPQ | 375    |
| A3A1          | 53       | GQQQ QFPF QPQY PQPQ PFPF |        | 46             | G16A 89        | PQPQ FFPQ QTTF PQPQ QLPF | 376    |
| A4A           | 53       | GQQE QFPF QPQY PHQQ PFPF |        | 47             | <b>POOL 49</b> |                          |        |
| A4D           | 53       | GQQE RFPF QPQY PHQQ PFPF |        | 48             | G15A 97        | PQPQ FFPQ QPQY QPFP QPQY | 377    |
| <b>POOL 7</b> |          |                          |        | 49             | G15A 105       | QQPQ QPFP QPQY QQPF PQPQ | 378    |
| A1A1          | 61       | QQPY PQPQ PFPF QLPY LQLQ |        | 50             | G15A 113       | QQPQ QPFP PQPQ PQPQ FFPF | 379    |
| A1A3          | 61       | QQPY PQPQ PFPF QLPY LQLQ |        | 51             | G15A 121       | QQPQ PQPQ FFPQ QPQY LFPF | 380    |
| A1B1          | 61       | QQPY PQPQ PFPF QPQY LQLQ |        | 52             | G11A 126       | QQPF PQPQ QPQY PQPQ QQPF | 381    |
| A2B1          | 61       | QQPY PQPQ PFPF QPQY LQLQ |        | 53             | G12A 126       | QQPF PQPQ QPFP PQPQ PQPQ | 382    |
| A4A           | 61       | QQPY PHQQ PFPF QPQY PQPQ |        | 54             | G13A 126       | QQPF PQPQ QQTY PQPQ PQPQ | 383    |
| A1A1          | 69       | PFPF QLPY LQLQ PFPQ PQLP |        | 55             | G14 126        | RQPF PQPQ QPQY PQPQ QQPF | 384    |
| A1B1          | 69       | PFPF QPQY LQLQ PFPQ PQLP |        | <b>POOL 50</b> |                |                          |        |
| A1B10         | 69       | PFPF QPQY LQLQ PFPQ PQLP |        | 56             | G15A 126       | QQPF PQPQ QPQL FFPQ PQPQ | 385    |
| <b>POOL 8</b> |          |                          |        | 57             | G15C 126       | QQPF PQPQ QAQL FFPQ PQPQ | 386    |
| A1B11         | 69       | PFPF QPQY LQLQ PFPQ PQLP |        | 58             | G16A 126       | QQTF PQPQ QLPF PQPQ QQPF | 387    |
| A1B12         | 69       | PFPF QPQY LQLQ PFPQ PQLP |        | 59             | G11A 134       | QQPY PQPQ QQPF PQPQ PQPQ | 388    |
| A2A1          | 69       | PFPF QPQY LQLQ PFPQ PQLP |        | 60             | G12A 134       | QQPF PQPQ QPQY FFPQ PQPQ | 389    |
| A2B1          | 69       | PFPF QPQY LQLQ PFPQ PQLP |        | 61             | G13A 134       | QQTY PQPQ QQPF PQPQ PQPQ | 390    |
| A2B2          | 69       | PFPF QPQY LQLQ PFPQ PQLP |        |                | G15A 134       | QPQL FFPQ PQPQ PQPQ FFPQ | 391    |

[illegible]

A2A1 138 QQQQ QQQQ QQQQ QQQQ QQQI  
**POOL 17**  
A4B 139 AQQQ QQQQ QQQQ QQQQ TLQQ  
A1A1 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLIP  
A1A6 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLIP  
A1B6 146 QQQQ QQQQ ILQQ MLQQ QLIP  
A1B10 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLTP  
A1B11 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLIP  
A2A1 146 QQQQ QQQQ QQQI LQQI LQQQ  
A3A2 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLIP  
**POOL 18**  
A4A 146 QQQQ QQQQ TLQQ ILQQ QLIP  
A1A1 163 ILQQ ILQQ QLIP CMDV VLQQ  
A1B6 163 ILQQ MLQQ QLIP CMDV VLQQ  
A1B10 163 ILQQ ILQQ QLTP CMDV VLQQ  
A2B1 163 ILQQ ILQQ QLIP CRDV VLQQ  
A3A2 163 ILQQ ILQQ QLIP CRDV VLQQ  
A4A 163 TLQQ ILQQ QLIP CRDV VLQQ  
A1A1 171 QLIP CMDV VLQQ HNIA HGRS  
**POOL 19**  
A1A3 171 QLIP CMDV VLQQ HNIA HGRS  
A1B2 171 QLIP CMDV VLQQ HNIA HGRS  
A1B7 171 QLIP CMDV VLQQ HNIA HGRS  
A1B10 171 QLIP CMDV VLQQ HNIA HGRS  
A1B11 171 QLIP CMDV VLQQ HNIA HGRS  
A2A1 171 QLIP CRDV VLQQ HSIA YGSS  
A2B1 171 QLIP CRDV VLQQ HSIA YGSS  
A2B3 171 QLIP CRDV VLQQ HNIA HGRS  
**POOL 20**  
A3A1 171 QLIP CRDV VLQQ HNIA HGRS  
A3B1 171 QLIP CRDV VLQQ HNIA HGRS  
A1A1 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A1A3 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A1B2 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A1B7 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A1B10 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A1B11 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
**POOL 21**  
A2A1 179 VLQQ HSIA YGSS QVLQ QSTY  
A2B1 179 VLQQ HSIA YGSS QVLQ QSTY  
A2B3 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A3A1 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A3B1 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A4A 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY  
A1A1 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
A1A3 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
**POOL 22**  
A1B8 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
A1B11 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
A2A1 187 YGSS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
A2B1 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
A2B3 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
A3A1 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
A3B1 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
A4A 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC  
**POOL 23**  
A1A1 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
A1A3 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
A1B8 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
A2A1 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
A2B1 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
A2B3 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
A3A1 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
A3B1 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
A4A 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE  
**POOL 24**  
A1A1 203 ELCC QHLW QIPE QSLQ QAIH  
A1B6 203 ELCC QHLW QIPE QSLQ QAIH  
A1B10 203 ELCC QHLW QIPE QSLQ QAIH  
A2A1 203 QSLQ QHLW QIPE QSLQ QAIH  
A2B1 203 QSLQ QHLW QIPE QSLQ QAIH  
A3B1 203 QSLQ QHLW QIPE QSLQ QAIH  
**POOL 25**

126 G15C 250 ILPR SDCQ VMQQ QCCQ QLAQ 456  
**POOL 59**  
127 G11A 258 VMQQ QCCQ QLAQ IPQQ LQCA 457  
128 G15A 258 VMQQ QCCQ QLAQ IPQQ LQCA 458  
129 G15C 258 VMQQ QCCQ QLAQ IPQQ LQCA 459  
130 G16A 258 VMQQ QCCQ QLAQ IPQQ LQCA 460  
131 G11A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT IVHS 461  
132 G11B 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT IVHS 462  
133 G12A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT IVHS 463  
134 G13A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT IVHS 464  
**POOL 60**  
135 G15A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT IVHS 465  
136 G15C 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT IVHS 466  
137 G16A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT IVHS 467  
138 G11A 274 LQCA AIHT IVHS IIMQ QEQQ 468  
139 G11B 274 LQCA AIHT IVHS IIMQ QEQQ 469  
140 G12A 274 LQCA AIHT IVHS IIMQ QEQQ 470  
141 **POOL 61**  
142 G13A 274 LQCA AIHT IVHS IIMQ QEQQ 471  
143 G14 274 LQCA AIHT IVHS IIMQ QEQQ 472  
144 G15A 274 LQCA AIHT IVHS IIMQ QEQQ 473  
145 G16A 274 LQCA AIHT IVHS IIMQ QEQQ 474  
146 G11A 282 IIMQ IIMQ QEQQ EQQQ GMHI 475  
147 G11B 282 IIMQ IIMQ QEQQ EQQQ GMHI 476  
148 G12A 282 IIMQ IIMQ QEQQ EQQQ GMHI 477  
149 G13A 282 IIMQ IIMQ QEQQ EQQQ GMHI 478  
**POOL 62**  
150 G14 282 IIMQ IIMQ QEQQ EQQQ GMHI 479  
151 G15A 282 IIMQ IIMQ QEQQ EQQQ GMHI 480  
152 G15C 282 IIMQ IIMQ QEQQ EQQQ GMHI 481  
153 G16A 282 IIMQ IIMQ QEQQ EQQQ GMHI 482  
154 G11A 290 QEQQ EQQQ GMHI LPL YQQQ 483  
155 G12A 290 QEQQ EQQQ GMHI LPL YQQQ 484  
156 G12B 290 QEQQ EQQQ GMHI LPL YQQQ 485  
157 G13A 290 QEQQ EQQQ GMHI LPL YQQQ 486  
**POOL 63**  
158 G14 290 QEQQ EQQQ GMHI LPL YQQQ 487  
159 G15A 290 QEQQ EQQQ GMHI LPL YQQQ 488  
160 G15C 290 QEQQ EQQQ GMHI LPL YQQQ 489  
161 G16A 290 QEQQ EQQQ GMHI LPL YQQQ 490  
162 G11A 305 GMHI LPL YQQQ QVGG GTLV 491  
163 G12A 305 GMHI LPL YQQQ QVGG GTLV 492  
164 G12B 305 GMHI LPL YQQQ QVGG GTLV 493  
165 G13A 305 GMHI LPL YQQQ QVGG GTLV 494  
**POOL 64**  
166 G14 305 GMHI LPL YQQQ QVGG GTLV 495  
167 G15A 305 GMHI LPL YQQQ QVGG GTLV 496  
168 G15C 305 GMHI LPL YQQQ QVGG GTLV 497  
169 G16A 305 GMHI LPL YQQQ QVGG GTLV 498  
170 G11A 313 YQQQ QVGG GTLV QGQG IIP 499  
171 G12A 313 YQQQ QVGG GTLV QGQG IIP 500  
172 G12B 313 YQQQ QVGG GTLV QGQG IIP 501  
173 **POOL 65**  
174 G13A 313 YQQQ QVGG GTLV QGQG IIP 502  
175 G14 313 YQQQ QVGG GTLV QGQG IIP 503  
176 G15A 321 YQQQ QVGG GTLV QGQG IIP 504  
177 G15C 321 YQQQ QVGG GTLV QGQG IIP 505  
178 G16A 321 YQQQ QVGG GTLV QGQG IIP 506  
179 G11A 329 IIP QQA QLEA IRSL VLQT 507  
180 G12A 329 IIP QQA QLEA IRSL VLQT 508  
181 G13A 329 IIP QQA QLEA IRSL VLQT 509  
**POOL 66**  
182 G14 329 IIP QQA QLEA IRSL VLQT 510  
183 G15A 329 IIP QQA QLEA IRSL VLQT 511  
184 G15C 329 IIP QQA QLEA IRSL VLQT 512  
185 G16A 329 IIP QQA QLEA IRSL VLQT 513  
186 G11A 337 QLEA IRSL VLQT LPTM CNVY 514  
187 G12A 337 QLEA IRSL VLQT LPTM CNVY 515  
188 G13A 337 QLEA IRSL VLQT LPTM CNVY 516  
**POOL 67**  
189 G14 337 QLEA IRSL VLQT LPTM CNVY 517  
190 G15A 337 QLEA IRSL VLQT LPTM CNVY 518

|         |     |      |      |      |      |      |  |         |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
|---------|-----|------|------|------|------|------|--|---------|---------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| A3B3    | 203 | GLCC | QQLL | QIPE | QSQC | QAIH |  | 189     | GI5C    | 337  | QYEV | IRSL | VLRT | LPNM | CNVY | 519  |     |
| A4A     | 203 | QLCC | QQLF | QIPE | QSRC | QAIH |  | 190     | GI6A    | 337  | QLEG | IRSL | VLKT | LPTM | CNVY | 520  |     |
| A1A1    | 211 | QIPE | QSQC | QAIH | NVVH | AHL  |  | 191     | GI1A    | 345  | VLQT | LPTM | CNVY | VPPE | CSII | 521  |     |
| A1B3    | 211 | QIPE | QSQC | QAIQ | NVVH | AHL  |  | 192     | GI2A    | 345  | VLQT | LPSM | CNVY | VPPE | CSIM | 522  |     |
| A1B6    | 211 | QILE | QSQC | QAIH | NVVH | AHL  |  | 193     | GI3A    | 345  | VLQT | LATM | CNVY | VPPY | CSTI | 523  |     |
| A1B9    | 211 | QIPE | QSQC | QAIH | KVVH | AHL  |  | 194     | GI5A    | 345  | VLGT | LPTM | CNVY | VPPE | CSTT | 524  |     |
| A1B10   | 211 | QIPE | KLQC | QAIH | NVVH | AHL  |  | 195     | GI5C    | 345  | VLRT | LPNM | CNVY | VRPD | CSTI | 525  |     |
| A2A1    | 211 | QIPE | QSRC | QAIH | NVVH | AHL  |  | 196     | GI6A    | 345  | VLKT | LPTM | CNVY | VPPD | CSTI | 526  |     |
| POOL 26 |     |      |      |      |      |      |  | POOL 68 |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A3B3    | 211 | QIPE | QSQC | QAIH | NVAH | AHIM |  | 197     | GI1A    | 353  | CNVY | VPPE | CSII | KAPF | SSVV | 527  |     |
| A4A     | 211 | QIPE | QSRC | QAIH | NVVH | AHL  |  | 198     | GI2A    | 353  | CNVY | VPPE | CSIM | RAPF | ASIV | 528  |     |
| A1A1    | 219 | QAIH | NVVH | AHL  | HQQQ | KQQQ |  | 199     | GI3A    | 353  | CNVY | VPPY | CSTI | RAPF | ASIV | 529  |     |
| A1A6    | 219 | QAIH | NVVH | AHL  | HQQQ | KQQQ |  | 200     | GI5A    | 353  | CNVY | VPPE | CSTT | KAPF | ASIV | 530  |     |
| A1B3    | 219 | QAIQ | NVVH | AHL  | HQQQ | KQQQ |  | 201     | GI5C    | 353  | CNVY | VRPD | CSTI | NAPF | ASIV | 531  |     |
| A1B9    | 219 | QAIH | KVVH | AHL  | HQQQ | KQQQ |  | 202     | GI6A    | 353  | CNVY | VPPD | CSTI | NVPY | ANID | 532  |     |
| A1B13   | 219 | QAIH | NVVH | AHL  | HQQQ | QQQQ |  | 203     | GI1A    | 361  | CSII | KAPF | SSVV | AGIG | GQ   | 533  |     |
| A2B3    | 219 | QAIH | NVVH | AHL  | HQQH | HHHQ |  | 204     | GI2A    | 361  | CSIM | RAPF | ASIV | AGIG | GQ   | 534  |     |
| POOL 27 |     |      |      |      |      |      |  | POOL 69 |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A3A1    | 219 | QAIH | NVVH | AHL  | HQQQ | RQQQ |  | 205     | GI3A    | 361  | CSTI | RAPF | ASIV | AGIG | GQYR | 535  |     |
| A3B1    | 219 | QAIH | NVVH | AHIM | HQQE | QQQQ |  | 206     | GI4     | 361  | CSTI | RAPF | ASIV | ASIG | GQ   | 536  |     |
| A3B3    | 219 | QAIH | NVAH | AHIM | HQQQ | QQQQ |  | 207     | GI5A    | 361  | CSTT | KAPF | ASIV | ADIG | GQ   | 537  |     |
| A4A     | 219 | QAIH | NVVH | AHL  | HHHQ | QQQQ |  | 208     | GI5C    | 361  | CSTI | NAPF | ASIV | AGIS | GQ   | 538  |     |
| A1A1    | 227 | AHL  | HQQQ | KQQQ | QPS  | QVSF |  | 209     | GI6A    | 361  | CSTI | NVPY | ANID | AGIG | GQ   | 539  |     |
| A1A6    | 227 | AHL  | HQQQ | KQQQ | QPPS | SQFS |  | 210     | GI1     | 1    | PQQP | FPLQ | PQSS | FLWQ | SQQP | 540  |     |
| A1B2    | 227 | AHL  | HQQQ | KQQQ | QLSS | QVSF |  | 211     | GI1     | 9    | PQSS | FLWQ | SQQP | FLQQ | PQQP | 541  |     |
| A1B10   | 227 | AHL  | HQQQ | KQQQ | PSSQ | VSFQ |  | 212     | GI1     | 17   | SQQP | FLQQ | PQQP | SPQP | QQVV | 542  |     |
| POOL 28 |     |      |      |      |      |      |  | POOL 70 |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A1B13   | 227 | AHL  | HQQQ | QQQQ | EQKQ | QLQQ |  | 213     | GI1     | 25   | PQQP | SPQP | QQVV | QHS  | PATP | 543  |     |
| A2A1    | 227 | AHL  | HQQQ | QQQQ | QQQQ | QPLS |  | 214     | GI1     | 33   | QQVV | QHS  | PATP | TTIP | SAGK | 544  |     |
| A2B3    | 227 | AHL  | HQQH | HHHQ | QQQQ | QQQQ |  | 215     | GI1     | 41   | PATP | TTIP | SAGK | PISA | PPPQ | 545  |     |
| A2B4    | 227 | AHL  | HQQH | HHHQ | EQKQ | QLQQ |  | 216     | GI1     | 49   | SAGK | PISA | PPPQ | QQQQ | HQQL | 546  |     |
| A3A1    | 227 | AHL  | HQQQ | RQQQ | PSSQ | VSLQ |  | 217     | GI1     | 57   | PPPQ | QQQQ | HQQL | AQQQ | IPVV | 547  |     |
| A3B1    | 227 | AHIM | HQQE | QQQQ | LQQQ | QQQQ |  | 218     | GI1     | 65   | HQQL | AQQQ | IPVV | QPSI | LQQL | 548  |     |
| A3B3    | 227 | AHIM | HQQQ | QQQQ | EQKQ | QLQQ |  | 219     | GI1     | 73   | IPVV | QPSI | LQQL | NPCK | VFLQ | 549  |     |
| A4A     | 227 | AHL  | HHHQ | QQQQ | QPS  | QVSF |  | 220     | GI1     | 81   | LQQL | NPCK | VFLQ | QQCS | PVAM | 550  |     |
| POOL 29 |     |      |      |      |      |      |  | POOL 71 |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A1A1    | 235 | KQQQ | QPS  | QVSF | QQPL | QQYP |  | 221     | GI1     | 89   | VFLQ | QQCS | PVAM | PQRL | ARSQ | 551  |     |
| A1A6    | 235 | KQQQ | QPS  | QVSF | QQPL | QQYP |  | 222     | GI1     | 97   | PVAM | PQRL | ARSQ | MLQQ | SSCH | 552  |     |
| A1B2    | 235 | KQQQ | QLSS | QVSF | QQPQ | QQYP |  | 223     | GI1     | 105  | ARSQ | MLQQ | SSCH | VMQQ | QCCQ | 553  |     |
| A1B10   | 235 | KQQQ | PSSQ | VSFQ | QPQQ | QYPL |  | 224     | GI1     | 113  | SSCH | VMQQ | QCCQ | QLPQ | IPQQ | 554  |     |
| A1B13   | 235 | QQQQ | EQKQ | QLQQ | QQQQ | QQQL |  | 225     | GI1     | 121  | QCCQ | QLPQ | IPQQ | SRYQ | AIRA | 555  |     |
| A2B4    | 235 | HHHQ | EQKQ | QLQQ | QQQQ | QQQL |  | 226     | GI1     | 127B | PQIP | QQR  | YEA  | RAI  | YSII | 556  |     |
| A3A1    | 235 | RQQQ | PSSQ | VSLQ | QPQQ | QYPS |  | 227     | GI1     | 129  | IPQQ | SRYQ | AIRA | IYS  | ILQ  | 557  |     |
| A3B1    | 235 | QQQQ | LQQQ | QQQQ | LQQQ | QQQQ |  | 228     | GI1     | 137  | AIRA | IYS  | ILQ  | EQQQ | VQGS | 558  |     |
| POOL 30 |     |      |      |      |      |      |  | POOL 72 |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A4A     | 235 | QQQQ | QPS  | QVSF | QQPQ | EQYP |  | 229     | GI1     | 145  | ILQ  | EQQQ | VQGS | IQSQ | QQQP | 559  |     |
| A1B13   | 243 | QLQQ | QQQQ | QQQL | QQQQ | QKQQ |  | 230     | GI1     | 153  | VQGS | IQSQ | QQQP | QLLG | QCVS | 560  |     |
| A1B13   | 251 | QQQL | QQQQ | QKQQ | QPPS | SQVS |  | 231     | GI1     | 161  | QQQP | QLLG | QCVS | QPQQ | QSQQ | 561  |     |
| A2A1    | 260 | QQQQ | QQQQ | QPLS | QVSF | QQPQ |  | 232     | GI1     | 169  | QCVS | QPQQ | QSQQ | QLGQ | QPQQ | 562  |     |
| A2B1    | 260 | QQQQ | QQQQ | QPLS | QVCF | QQSQ |  | 233     | GI1     | 177  | QSQQ | QLGQ | QPQQ | QQLA | QGTf | 563  |     |
| A2B3    | 260 | HHHQ | QQQQ | QQQQ | QPLS | QVSF |  | 234     | GI1     | 185  | QPQQ | QQLA | QGTf | LQPH | QIAQ | 564  |     |
| A3B1    | 260 | QQQQ | QQQQ | QPPS | QVSF | QQPQ |  | 235     | POOL 73 |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A2A1    | 289 | QPLS | QVSF | QQPQ | QQYP | SGQG |  | 236     | GI1     | 193  | QGTf | LQPH | QIAQ | LEVY | TSIA | 565  |     |
| POOL 31 |     |      |      |      |      |      |  | POOL 74 |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A2B1    | 289 | QPLS | QVCF | QQSQ | QQYP | SGQG |  | 237     | GI1     | 201  | QIAQ | LEVY | TSIA | LRIL | PTMC | 566  |     |
| A3B1    | 289 | QPS  | QVSF | QQPQ | QQYP | SSQV |  | 238     | GI1     | 209  | TSIA | LRIL | PTMC | SVNV | PLYR | 567  |     |
| A1A1    | 293 | QVSF | QQPL | QQYP | LGQG | SFRP |  | 239     | GI1     | 217  | PTMC | SVNV | PLYR | TTTS | VPEG | 568  |     |
| A1A6    | 293 | QVSF | QQPL | QQYP | LGQG | SFRP |  | 240     | GI1     | 1A   | 1    | TTTR | TTPI | PTIS | SNNN | HHFR | 569 |
| A1B2    | 293 | QVSF | QQPQ | QQYP | LGQG | SFRP |  | 241     | GI1     | 1A   | 9    | PTIS | SNNN | HHFR | SNSN | HHFH | 570 |
| A2A1    | 293 | QVSF | QQPQ | QQYP | SGQG | SFQP |  | 242     | GI1     | 1A   | 17   | HHFR | SNSN | HHFH | SNNN | QFYR | 571 |
| A2B1    | 293 | QVCF | QQSQ | QQYP | SGQG | SFQP |  | 243     | POOL 75 |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A2B3    | 293 | QVSF | QQPQ | QQYP | SGQG | SFQP |  | 244     | GI1     | 1A   | 25   | HHFH | SNNN | QFYR | NNNS | PGHN | 572 |
| POOL 32 |     |      |      |      |      |      |  | POOL 76 |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
| A2B5    | 293 | QVSF | QQPQ | QQYP | SGQG | FFQP |  | 245     | GI1     | 1A   | 33   | QFYR | NNNS | PGHN | NPLN | NNNS | 573 |
| A3A1    | 293 | QVSL | QQPQ | QQYP | SGQG | FFQP |  | 246     | GI1     | 1A   | 41   | PGHN | NPLN | NNNS | PNNN | SPSN | 574 |
| A3B1    | 293 | QVSF | QQPQ | QQYP | SSQV | SFQP |  | 247     | GI1     | 1A   | 49   | NNNS | PNNN | SPSN | HEMN | SPNN | 575 |
| A3B2    | 293 | QVSF | QQPQ | QQYP | SSQV | SFQP |  | 248     | GI1     | 1A   | 57   | SPSN | HHNN | SPNN | NFQY | HTHP | 576 |
| A4A     | 293 | QVSF | QQPQ | EQYP | SGQV | SFQS |  | 249     | GI1     | 1A   | 65   | SPNN | NFQY | HTHP | SNHK | NLPH | 577 |
| A1A1    | 301 | QQYP | LGQG | SFRP | SQQN | PQAQ |  | 250     | GI1     | 1A   | 73   | HTHP | SNHK | NLPH | TNNI | QQQQ | 578 |
| A1B2    | 301 | QQYP | LGQG | SFRP | SQQN | SQAQ |  | 251     | GI1     | 1A   | 81   | NLPH | TNNI | QQQQ | PPFS | QQQQ | 579 |
| A2A1    | 301 | QQYP | SGQG | SFQP | SQQN | PQAQ |  | 252     | POOL 77 |      |      |      |      |      |      |      |     |
| POOL 33 |     |      |      |      |      |      |  | POOL 78 |         |      |      |      |      |      |      |      |     |
|         |     |      |      |      |      |      |  | 253     | GI1     | 1A   | 89   | QQQQ | PPFS | QQQQ | PPFS | QQQQ | 580 |
|         |     |      |      |      |      |      |  | 254     | GI1     | 1A   | 97   | QQQQ | PPFS | QQQQ | PVLP | QQSP | 581 |

|         |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
|---------|---------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| A2B3    | 301     | QQYP | SGQG | FFQP  | SQQN  | PQAQ  | 583   |       |     |
| A2B5    | 301     | QQYP | SGQG | FFQP  | FQQN  | PQAQ  | 584   |       |     |
| A3A1    | 301     | QQYP | SGQG | FFQP  | SQQN  | PQAQ  | 585   |       |     |
| A3B1    | 301     | QQYP | SSQV | SFQP  | SQLN  | PQAQ  | 586   |       |     |
| A3B2    | 301     | QQYP | SSQG | SFQP  | SQQN  | PQAQ  | 587   |       |     |
| A4A     | 301     | EQYP | SGQV | SFQS  | SQQN  | PQAQ  | 588   |       |     |
| A1B1    | 309     | SFRP | SQQN | PLAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A1A1    | 309     | SFRP | SQQN | PQAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| POOL 34 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| A1A3    | 309     | SFRP | SQQN | PQTQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A1B2    | 309     | SFRP | SQQN | SQAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A1B3    | 309     | SFRP | SQQN | PQDQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A1B4    | 309     | SFRP | SQQN | PRAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A2A1    | 309     | SFQP | SQQN | PQAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A2B3    | 309     | FFQP | SQQN | PQAQ  | GSFQ  | PQQL  |       |       |     |
| A2B5    | 309     | FFQP | FQQN | PQAQ  | GSFQ  | PQQL  |       |       |     |
| A3A1    | 309     | FFQP | SQQN | PQAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| Pool 35 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| A3B1    | 309     | SFQP | SQLN | PQAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A3B1    | 309     | SFQP | SQLN | PQAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A3B2    | 309     | SFQP | SQQN | PQAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A4A     | 309     | SFQS | SQQN | PQAQ  | GSVQ  | PQQL  |       |       |     |
| A1A1    | 317     | PQAQ | GSVQ | PQQL  | PQFE  | EIRN  |       |       |     |
| A1A3    | 317     | PQTQ | GSVQ | PQQL  | PQFE  | EIRN  |       |       |     |
| A1A6    | 317     | PQAQ | GSVQ | PQQL  | PQFE  | IRNL  |       |       |     |
| A1B1    | 317     | PLAQ | GSVQ | PQQL  | PQFE  | EIRN  |       |       |     |
| POOL 36 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| A1B3    | 317     | PQDQ | GSVQ | PQQL  | PQFE  | EIRN  |       |       |     |
| A1B4    | 317     | PRAQ | GSVQ | PQQL  | PQFE  | EIRN  |       |       |     |
| A2B3    | 317     | PQAQ | GSFQ | PQQL  | PQFE  | EIRN  |       |       |     |
| A2B5    | 317     | PQAQ | GSFQ | PQQL  | PQFE  | AI RN |       |       |     |
| A3B1    | 317     | PQAQ | GSVQ | PQQL  | PQFA  | EIRN  |       |       |     |
| A4A     | 317     | PQAQ | GSVQ | PQQL  | PQFQ  | EIRN  |       |       |     |
| Pool 37 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| A1A1    | 325     | PQQL | PQFE | EIRN  | LALQ  | TLPA  |       |       |     |
| A1A6    | 325     | PQQL | PQFE | IRNL  | ALQT  | LPAM  |       |       |     |
| A1B12   | 325     | PQQL | PQFE | EIRN  | LARK  |       |       |       |     |
| A2A1    | 325     | PQQL | PQFE | EIRN  | LALQ  | TLPA  |       |       |     |
| A2B5    | 325     | PQQL | PQFE | AI RN | LALQ  | TLPA  |       |       |     |
| A3B1    | 325     | PQQL | PQFA | EIRN  | LALQ  | TLPA  |       |       |     |
| A4A     | 325     | PQQL | PQFQ | EIRN  | LALQ  | TLPA  |       |       |     |
| A1A1    | 333     | EIRN | LALQ | TLPA  | MCNV  | YIPP  |       |       |     |
| POOL 38 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| A1A3    | 333     | EIRN | LALQ | TLPS  | MCNV  | YIPP  |       |       |     |
| A2A1    | 333     | EIRN | LALQ | TLPA  | MCNV  | YIPP  |       |       |     |
| A3A1    | 333     | EIRN | LALQ | TLPR  | MCNV  | YIPP  |       |       |     |
| A1A1    | 341     | TLPA | MCNV | YIPP  | YCTI  | APFG  |       |       |     |
| A1A3    | 341     | TLPS | MCNV | YIPP  | YCTI  | APFG  |       |       |     |
| A1B1    | 341     | TLPA | MCNV | YIPP  | YCTI  | VPFG  |       |       |     |
| A1B4    | 341     | TLPA | MCNV | YIPP  | YCAM  | APFG  |       |       |     |
| A1B9    | 341     | TLPA | MCNV | YIPP  | YCTI  | TPFG  |       |       |     |
| Pool 39 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| A2A1    | 341     | TLPA | MCNV | YIPP  | YCTI  | APVG  |       |       |     |
| A2B2    | 341     | TLPA | MCNV | YIPP  | YCST  | TIAP  |       |       |     |
| A3A1    | 341     | TLPR | MCNV | YIPP  | YCST  | TIAP  |       |       |     |
| A3A2    | 341     | TLPR | MCNV | YIPP  | YCST  | TIAP  |       |       |     |
| A3B1    | 341     | TLPA | MCNV | YIPP  | HCST  | TIAP  |       |       |     |
| A1A1    | 349     | YIPP | YCTI | APFG  | IFGT  | NYR   |       |       |     |
| A1B1    | 349     | YIPP | YCTI | VPFG  | IFGT  | NYR   |       |       |     |
| A1B4    | 349     | YIPP | YCAM | APFG  | IFGT  | NYR   |       |       |     |
| Pool 40 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| A1B5    | 349     | YIPP | YCTI | APFG  | IFGT  | NYR   |       |       |     |
| A1B9    | 349     | YIPP | YCTI | TPFG  | IFGT  | N     |       |       |     |
| A2A1    | 349     | YIPP | YCTI | APVG  | IFGT  | NYR   |       |       |     |
| A2B2    | 349     | YIPP | YCST | TIAP  | VGIF  | GTN   |       |       |     |
| A3A2    | 349     | YIPP | YCST | TIAP  | FGIF  | GTN   |       |       |     |
| A3B1    | 349     | YIPP | HCST | TIAP  | FGIF  | GTN   |       |       |     |
| A3B3    | 349     | YIPP | HCST | TIAP  | FGIS  | GTN   |       |       |     |
| A4D     | 350     | IPFY | CSTT | IAPF  | GIFG  | TNYR  |       |       |     |
| Pool 41 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| G11A    | 17      | GTAN | MQVD | PSSQ  | VQWP  | QQQP  |       |       |     |
| G12A    | 17      | GTAN | IQVD | PSGQ  | VQWL  | QQQL  |       |       |     |
| 253     | G111    | 1A   | 105  | QQQQ  | PVLP  | QQSP  | FSQQ  | QQLV  | 583 |
| 254     | G111    | 1A   | 113  | QQSP  | FSQQ  | QQLV  | LPPQ  | QQQQ  | 584 |
| 255     | G111    | 1A   | 121  | QQLV  | LPPQ  | QQQQ  | QLVQ  | QQIP  | 585 |
| 256     | G111    | 1A   | 129  | QQQQ  | QLVQ  | QQIP  | IVQP  | SVLQ  | 586 |
| 257     | G111    | 1A   | 137  | QQIP  | IVQP  | SVLQ  | QLNP  | CKVF  | 587 |
| 258     | G111    | 1A   | 145  | SVLQ  | QLNP  | CKVF  | LQQQ  | CSPV  | 588 |
| 259     | POOL 76 |      |      |       |       |       |       |       |     |
| 260     | G111    | 1A   | 153  | CKVF  | LQQQ  | CSPV  | AMPQ  | RLAR  | 589 |
|         | G111    | 1A   | 161  | CSPV  | AMPQ  | RLAR  | SQM W | QQSS  | 590 |
| 261     | G111    | 1A   | 169  | RLAR  | SQM W | QQSS  | CHVM  | QQQC  | 591 |
| 262     | G111    | 1A   | 177  | QQSS  | CHVM  | QQQC  | CQQL  | QQIP  | 592 |
| 263     | G111    | 1A   | 185  | QQQC  | CQQL  | QQIP  | BQSR  | YEA I | 593 |
| 264     | G111    | 1A   | 193  | QQIP  | BQSR  | YEA I | RAII  | YSII  | 594 |
| 265     | G111    | 1A   | 201  | YEA I | RAII  | YSII  | LQEQ  | QQGF  | 595 |
| 266     | G111    | 1A   | 209  | YSII  | LQEQ  | QQGF  | VQPQ  | QQQP  | 596 |
| 267     | POOL 77 |      |      |       |       |       |       |       |     |
| 268     | G111    | 1A   | 217  | QQGF  | VQPQ  | QQQP  | QQSG  | QGV S | 597 |
|         | G111    | 1A   | 225  | QQQP  | QQSG  | QGV S | QSQQ  | QSQQ  | 598 |
| 269     | G111    | 1A   | 233  | QGV S | QSQQ  | QSQQ  | QLGQ  | CSFQ  | 599 |
| 270     | G111    | 1A   | 241  | QSQQ  | QLGQ  | CSFQ  | QPQQ  | QLGQ  | 600 |
| 271     | G111    | 1A   | 249  | CSFQ  | QPQQ  | QLGQ  | QPQQ  | QQQQ  | 601 |
| 272     | G111    | 1A   | 257  | QLGQ  | QPQQ  | QQQQ  | QVLQ  | GTFL  | 602 |
| 273     | G111    | 1A   | 263  | QQQQ  | QVLQ  | GTFL  | QPHQ  | IAHL  | 603 |
| 274     | G111    | 1A   | 271  | GTFL  | QPHQ  | IAHL  | EAVT  | SIAL  | 604 |
| 275     | POOL 78 |      |      |       |       |       |       |       |     |
| 276     | G111    | 1A   | 279  | IAHL  | EAVT  | SIAL  | RTL P | TMCS  | 605 |
|         | G111    | 1A   | 287  | SIAL  | RTL P | TMCS  | VNVP  | LYSA  | 606 |
| 277     | G111    | 1A   | 295  | TMCS  | VNVP  | LYSA  | TTSV  | PFV G | 607 |
| 278     | G111    | 1A   | 303  | LYSA  | TTSV  | PFV G | GTG V | GAY   | 608 |
| 279     | G111    | 1B   | 26   | SCIS  | GLER  | PWQQ  | QPLP  | PQQS  | 609 |
| 280     | G111    | 1B   | 34   | PWQQ  | QPLP  | PQQS  | FSQQ  | PPFS  | 610 |
| 281     | G111    | 1B   | 42   | PQQS  | FSQQ  | PPFS  | QQQQ  | QPLP  | 611 |
| 282     | G111    | 1B   | 50   | PPFS  | QQQQ  | QPLP  | QQPS  | FSQQ  | 612 |
| Pool 79 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| 283     | G111    | 1B   | 58   | QPLP  | QQPS  | FSQQ  | QPPF  | SQQQ  | 613 |
| 284     | G111    | 1B   | 66   | FSQQ  | QPPF  | SQQQ  | PILS  | QOPP  | 614 |
| 285     | G111    | 1B   | 74   | SQQQ  | PILS  | QOPP  | FSQQ  | QQPV  | 615 |
| 286     | O 1A    | 17   | ATAA | RELN  | PSNK  | ELQS  | FSYQ  | QOPF  | 616 |
| 287     | O 1A    | 25   | PSNK | ELQS  | PQQS  | FSYQ  | QOPF  |       | 617 |
| 288     | O 1A    | 33   | PQQS | FSYQ  | QOPF  | PQQP  | YPQQ  |       | 618 |
| 289     | O 1A    | 41   | QOPF | PQQP  | YPQQ  | PYPS  | QQPY  |       | 619 |
| 290     | O 1A    | 49   | YPQQ | PYPS  | QQPY  | PSQQ  | PFPT  |       | 620 |
| POOL 80 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| 291     | O 1A    | 57   | QQPY | PSQQ  | PFPT  | PQQQ  | FPEQ  |       | 621 |
| 292     | O 1A    | 65   | PFPT | PQQQ  | FPEQ  | SQQP  | FTQP  |       | 622 |
| 293     | O 1A    | 73   | FPEQ | SQQP  | FTQP  | QQPT  | PIQP  |       | 623 |
| 294     | O 1A    | 81   | FTQP | QQPT  | PIQP  | QQPF  | PQQP  |       | 624 |
| 295     | O 1A    | 89   | PIQP | QQPF  | PQQP  | QQPQ  | QOPF  |       | 625 |
| 296     | O 1A    | 97   | PQQP | QQPQ  | QOPF  | PQQQ  | PPFW  |       | 626 |
| 297     | O 1A    | 105  | QOPF | QPQQ  | PPFW  | QPQQ  | PPFQ  |       | 627 |
| 298     | O 1A    | 113  | PPFW | QPQQ  | PPFQ  | TQQS  | FPLQ  |       | 628 |
| POOL 81 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| 299     | O 1A    | 121  | PPFQ | TQQS  | FPLQ  | PQQP  | FPQQ  |       | 629 |
| 300     | O 1A    | 129  | FPLQ | PQQP  | FPQQ  | PQQP  | FPQP  |       | 630 |
| 301     | O 1A    | 137  | FPQQ | PQQP  | FPQP  | QLPF  | PQQS  |       | 631 |
| 302     | O 1A    | 145  | FPQP | QLPF  | PQQS  | EQII  | PQQL  |       | 632 |
| 303     | O 1A    | 153  | PQQS | EQII  | PQQL  | QOPF  | PLQP  |       | 633 |
| 304     | O 1A    | 161  | PQQL | QOPF  | PLQP  | QOPF  | PQQP  |       | 634 |
| 305     | O 1A    | 169  | PLQP | QOPF  | PQQP  | QOPF  | PQPQ  |       | 635 |
| 306     | O 1A    | 177  | PQPQ | QOPF  | PQPQ  | QPIP  | VQPQ  |       | 636 |
| Pool 82 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| 307     | O 1A    | 185  | PQPQ | QPIP  | VQPQ  | QSFP  | QQSQ  |       | 637 |
| 308     | O 1A    | 193  | VQPQ | QSFP  | QQSQ  | QSQQ  | PFAQ  |       | 638 |
| 309     | O 1A    | 201  | QQSQ | QSQQ  | PFAQ  | PQQL  | FPFL  |       | 639 |
| 310     | O 1A    | 209  | PFAQ | PQQL  | FPFL  | QQPI  | PQQP  |       | 640 |
| 311     | O 1A    | 217  | FPFL | QQPI  | PQQP  | QOPF  | PLQP  |       | 641 |
| 312     | O 1A    | 225  | PQQP | QOPF  | PLQP  | QOPF  | PQQP  |       | 642 |
| 313     | O 1A    | 233  | PLQP | QOPF  | PQQP  | QOPF  | PQQP  |       | 643 |
| 314     | O 1A    | 241  | PQQP | QOPF  | PQQP  | QQSF  | PQQP  |       | 644 |
| POOL 83 |         |      |      |       |       |       |       |       |     |
| 315     | O 1A    | 249  | PQQP | QQSF  | PQQP  | QQPY  | PQQQ  |       | 645 |
| 316     | O 1A    | 257  | PQQP | QQPY  | PQQQ  | PYGS  | SLTS  |       | 646 |

|                                   |                                     |     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-----|
| G13A 17 ATAN MQVD PSGQ VPWP QQQP  | 317 O 1A 265 PQQQ PYGS SLTS IGGQ    | 647 |
| G13B 19 MN IQVD PSGQ VPWP QQQP FP | 318 O 1B 1 ARQL NPSD QELQ SPQQ LYPQ | 648 |
| G14 17 ATAN MQAD PSGQ VQWP QQQP   | 319 O 1B 9 QELQ SPQQ LYPQ QPYF QPY  | 649 |
| G15A 17 TTAN IQVD PSGQ VQWP QQQQ  | 320 O 1C 1 SRLS SPRG KELH TPQE QFPQ | 650 |
| G15C 17 ATAN MQVD PSGQ VQWP QQQP  | 321 O 1C 9 KELH TPQE QFPQ QQQF PQPQ | 651 |
| G17 20 QIVF PSGQ VQWP QQQQ PFF    | 322 O 1C 17 QFPQ QQQF PQPQ QFPQ     | 652 |
| Pool 42                           |                                     |     |
| G11A 25 PSSQ VQWP QQQP VPQP HQPF  | 323                                 |     |
| G12A 25 PSGQ VQWL QQQQ VPQL QQPL  | 324                                 |     |
| G13A 25 PSGQ VPWP QQQP FPQP HQPF  | 325                                 |     |
| G14 25 PSGQ VQWP QQQP FLQP HQPF   | 326                                 |     |
| G15A 25 PSGQ VQWP QQQQ PFPQ PQQP  | 327                                 |     |
| G15C 25 PSGQ VQWP QQQP FRQP QQPF  | 328                                 |     |
| G16A 25 PSGQ VQWP QQQP FPQP QQPF  | 329                                 |     |
| G11A 33 QQQP VPQP HQPF SQQP QQTF  | 330                                 |     |

\* Posición del resto en el terminal en la secuencia consenso

Tabla 24. 652 péptidos sintéticos y análisis ELISpot con pacientes y exposición al gluten

| SUJETO CELÍACO                        | C14   | C15 | C16 | C17 | C18 | C19 | C20 | C21 | C22 | C23 | C24     | C25 | C26 | C27 | C28 |
|---------------------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|
| HLA-DQ                                | 22    | 22  | 22  | 22  | 22  | 22  | 2X  | 2X  | 2X  | 2X  | 28      | 28  | 2X  | 2X  | 2X  |
| EXPOSICIÓN AL ANTÍGENO                | TRIGO |     |     |     |     |     |     |     |     |     | CENTENO |     |     |     |     |
| DURACIÓN DE LA EXPOSICIÓN (DÍAS)      | 3     | 3   | 6   | 3   | 6   | 3   | 3   | 3   | 3   | 0.5 | 3       | 1   | 3   | 3   | 3   |
| SFC DEL ELISPOT DEL PÉPTIDO DOMINANTE | 203   | 46  | 96  | 195 | 114 | 136 | 29  | 57  | 129 | 259 | 50      | 18  | 163 | 52  | 229 |
| SFC DEL ELISPOT DEL BLANCO            | 1     | 2   | 4   | 6.5 | 3   | 1   | 1   | 4   | 3   | 2   | 1       | 2   | 1   | 2   | 6   |

| Péptido | Secuencia            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------|----------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 1       | AVRVFPVQLQPNPSQQLPQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2       | MVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3       | MVRVFPVQLQPNPSQQHPQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4       | MVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5       | MVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 6       | AVRVSVPLQPNPSQQQPC   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 7       | AVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 8       | AVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 9       | AVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 10      | MVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 11      | AVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 12      | AVRVFPVQLQPNPSQQQPC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 13      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 14      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 15      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 16      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 17      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 18      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 19      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 20      | QPNPSQQQLPQEQVPLVQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 21      | QPNPSQQQLPQEQVPLVQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 22      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 23      | LQPNPSQQQLPQEQVPLVQQ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 24      | QLPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 25      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 26      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 27      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 28      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 29      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 30      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 31      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 32      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 33      | QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 34      | LVQQQQLGQQQFFPPQQPY  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 35      | LVQQQQLGQQQFFPPQQPY  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 36      | LVQQQQLGQQQFFPPQQPY  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 37      | LVQQQQLGQQQFFPPQQPY  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 38      | LVQQQQLGQQQFFPPQQPY  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 39      | LVQQQQLGQQQFFPPQQPY  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 40      | LMQQQQLGQQQFFPPQQPY  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 41      | LMQQQQLGQQQFFPPQQPY  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 42      | GQQQQLGQQQFFPPQQPY   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 43      | GQQQQLGQQQFFPPQQPY   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

[illegible]



[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]



[illegible]

[illegible]

[illegible]

70.1 a 100  
40.1 a 70  
25.1 a 40  
10.1 a 25  
5.1 a 10  
<5  
≥3 x B1

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado que comprende al menos un epítipo de linfocito T, en el que el péptido tiene una longitud no superior a 50 aminoácidos y el epítipo de linfocitos T comprende una secuencia seleccionada entre FPQPQQPFP y una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.
- 10 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia FPQPEQPFP.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el péptido tiene una longitud de 10-50 aminoácidos.
- 15 4. El péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, que comprende una secuencia seleccionada entre QQPFPQPQQPFP y una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia QQPFPQPQQPFP, y en el que opcionalmente hay presente una modificación en el extremo N terminal.
- 20 5. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que consiste en una secuencia seleccionada entre QQPFPQPQQPFPWQP o una secuencia que se puede obtener por desamidación por transglutaminasa de la secuencia QQPFPQPQQPFPWQP, y en el que opcionalmente hay presente una modificación en el extremo N terminal.
- 25 6. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que hay presente una modificación en el extremo N terminal.
7. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que hay presente una modificación en el extremo C terminal.
- 30 8. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que dichas modificaciones son modificaciones post-traduccionales naturales.
9. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que está restringido a HLA-DQ2.
- 35 10. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que está restringido a HLA-DQ8.
11. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende un epítipo de trigo.
12. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende un epítipo de trigo, un epítipo de cebada, y un epítipo de centeno.
- 40 13. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, para su uso en un método de tratamiento.
- 45 14. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende la secuencia FPQPEQPFP.
- 50 15. Una composición que comprende (a) un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, y (b) un segundo agente que es un péptido que comprende al menos un epítipo que comprende una secuencia seleccionada entre PQPELPY y QLQFPQPPELPYPQPS.
- 55 16. Una composición que comprende un primer agente restringido a HLA-DQ2 y un segundo agente restringido a HLA-DQ8, en la que la composición comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.
17. Una composición que comprende un agente que comprende un epítipo de trigo y un agente que

comprende un epítipo de centeno, en la que la composición comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.

- 5 18. Una composición que comprende un agente que comprende un epítipo de trigo y un agente que comprende un epítipo de cebada, en la que la composición comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.
- 10 19. Una composición que comprende un agente que comprende un epítipo de centeno y un agente que comprende un epítipo de cebada, en la que la composición comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.
- 15 20. Una composición que comprende un agente que comprende un epítipo de trigo, un agente que comprende un epítipo de cebada, y un agente que comprende un epítipo de centeno, en la que la composición comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP.
- 20 21. El péptido como se define en la reivindicación 13 para su uso en la inducción de tolerancia de un individuo a una proteína gliadina para suprimir la producción de una respuesta de linfocitos T a un péptido según se define en la reivindicación 13.
- 25 22. El péptido como se define en la reivindicación 13 para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad celíaca.
- 30 23. Una composición farmacéutica que comprende: (a) un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP; (b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; y, opcionalmente, (c) un péptido que comprende al menos un epítipo que comprende una secuencia seleccionada entre PQPELPY y QLQPFQPPELPYPQPQS.
- 35 24. Un método de diagnóstico de la enfermedad celíaca, o susceptibilidad a la enfermedad celíaca, en un individuo, que comprende:
  - 40 (a) contactar una muestra procedente del hospedador con al menos un péptido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, y opcionalmente, además, un péptido que comprende al menos un epítipo que contiene una secuencia seleccionada entre PQPELPY y QLQPFQPPELPYPQPQS;
  - 45 (b) determinar *in vitro* si los linfocitos T de la muestra reconocen el péptido; donde el reconocimiento por los linfocitos T indica que el individuo tiene, o es susceptible a, la enfermedad celíaca.
- 50 25. Uso de un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, para la preparación de un medio diagnóstico para su uso en un método de diagnosis de la enfermedad celíaca o de susceptibilidad a la enfermedad celíaca en un individuo, dicho método que comprende la determinación de si los linfocitos T del individuo reconocen el péptido, donde el reconocimiento por los linfocitos T indica que el individuo tiene, o es susceptible a, la enfermedad celíaca.
- 55 26. Un método o uso de acuerdo con las reivindicaciones 24 ó 25 en el que el péptido se une a (a) una molécula de HLA, o (b) un fragmento de una molécula de HLA capaz de unirse al péptido.
27. Un método o uso de acuerdo con la reivindicación 26 en el que la molécula o fragmento de HLA está en un complejo que comprende cuatro moléculas de HLA o fragmentos de moléculas de HLA.

28.      Uso de acuerdo con las reivindicaciones 25, 26 ó 27 en el que el método comprende la administración del péptido a la piel de un individuo y la detección de la presencia de inflamación en el sitio de administración, donde la detección de inflamación indica que los linfocitos T del individuo reconocen el péptido.
29.      Un método de acuerdo con las reivindicaciones 24, 26 ó 27 en el que la muestra es una muestra de sangre.
30.      Un método de acuerdo con las reivindicaciones 24, 26, 27 ó 29 en el que los linfocitos T no se vuelven a estimular de manera específica *in vitro* con el antígeno antes de dicha determinación.
31.      Un método o uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24-30 en el que el reconocimiento del péptido por los linfocitos T se determina detectando la secreción de una citoquina de los linfocitos T.
32.      Un método o uso de acuerdo con la reivindicación 31 en el que la citoquina es IFN- $\gamma$ .
33.      Un método o uso de acuerdo con la reivindicación 31 o la reivindicación 32 en el que se detecta la citoquina al permitir que la citoquina se una a un anticuerpo inmovilizado específico para la citoquina y a continuación la detección de la presencia del complejo de anticuerpo/citoquina.
34.      Un método o uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30 en el que dicha determinación se realiza midiendo si el péptido se une al receptor de linfocitos T.
35.      Un método para la identificación de un análogo, donde el análogo es un péptido de la invención como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, unido a una molécula de HLA o a un fragmento de una molécula de HLA como se define en las reivindicaciones 26 ó 27, donde el método comprende la determinación de si una sustancia candidata es reconocida por un receptor de los linfocitos T que reconoce un epítipo que comprende una secuencia que se puede obtener mediante desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, donde el reconocimiento de la sustancia indica que la sustancia es un análogo.
36.      Un método para la determinación de si una composición es capaz de provocar la enfermedad celíaca, que comprende la determinación de si hay presente en la composición una proteína que comprende una secuencia de oligopéptidos seleccionada entre FPQPQQPFP, QQPFPQPQQPFP y QQPFPQPQQPFP, donde la presencia de la proteína indica que la composición es capaz de provocar la enfermedad celíaca.
37.      Un método de acuerdo con la reivindicación 36 en el que dicha determinación se realiza poniendo en contacto la composición con un anticuerpo específico para dicha secuencia de oligopéptidos, donde la unión del anticuerpo a una proteína en la composición indica que la composición es capaz de provocar la enfermedad celíaca.
38.      Un anticuerpo que se une específicamente a una secuencia seleccionada entre FPQPQQPFP, QQPFPQPQQPFP y QQPFPQPQQPFPWQP.
39.      Un kit para llevar a cabo un método o uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 34, que comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido comprende una secuencia que se puede obtener mediante la desamidación por transglutaminasa de la secuencia FPQPQQPFP, y un medio para detectar el reconocimiento del péptido por el linfocito T.
40.      Un kit de acuerdo con la reivindicación 39 en el que los medios para detectar el reconocimiento comprende un anticuerpo dirigido contra IFN- $\gamma$ .
41.      Un kit de acuerdo con la reivindicación 40 en el que el anticuerpo se inmoviliza sobre un soporte sólido y, opcionalmente, el kit también comprende un medio para detectar el complejo anticuerpo/IFN- $\gamma$ .

42. Uso de un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para producir un anticuerpo específico para el péptido.

Fig.1a.

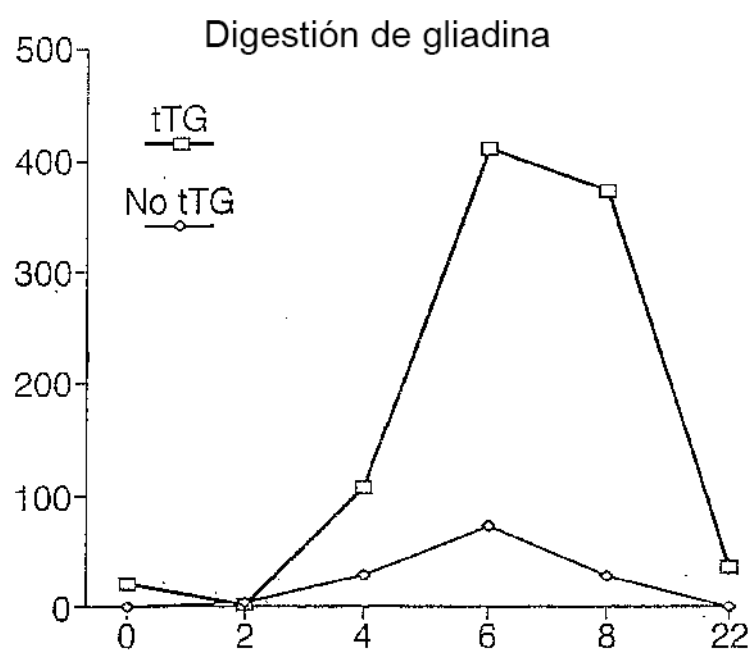
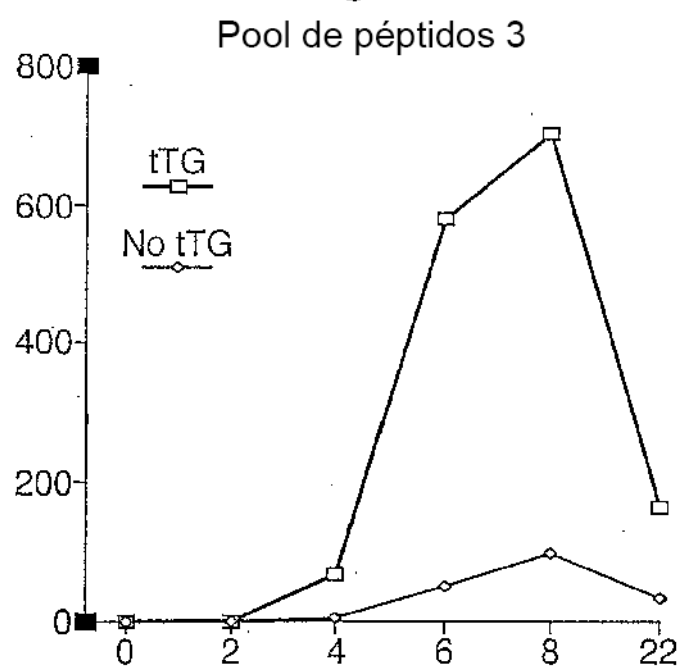
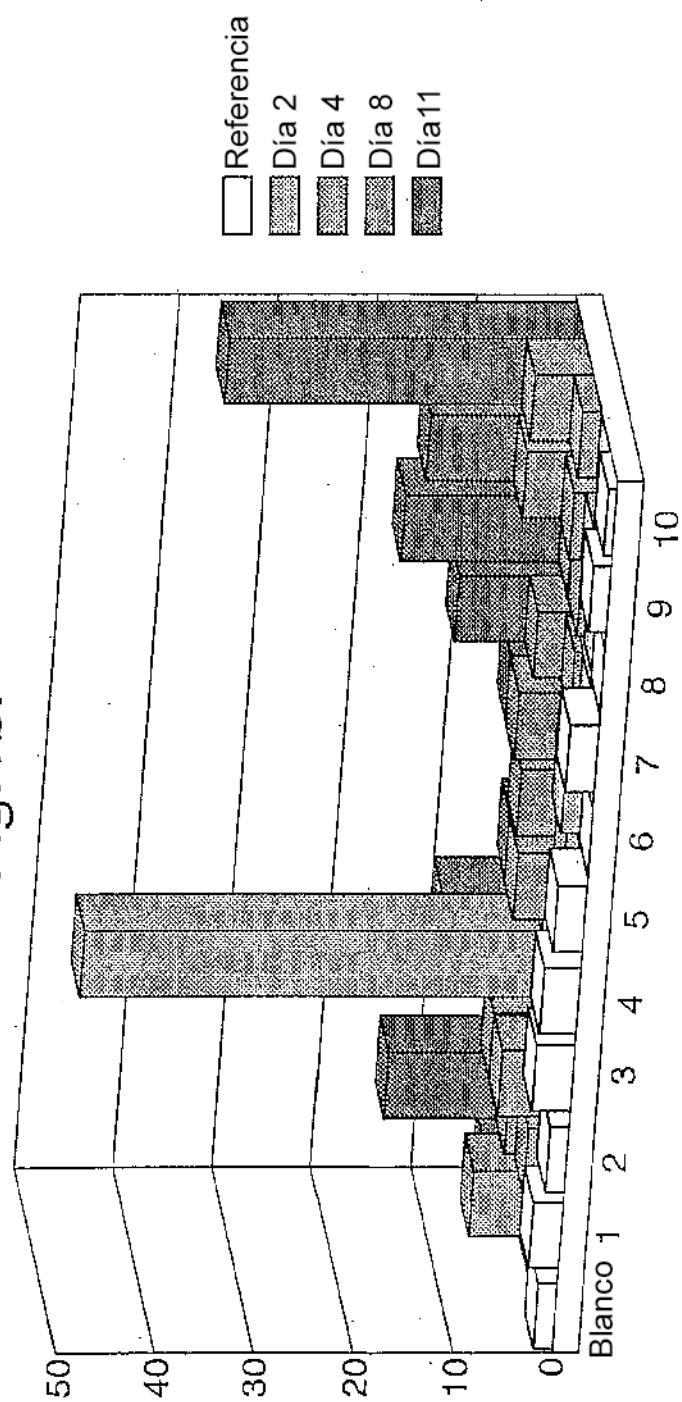
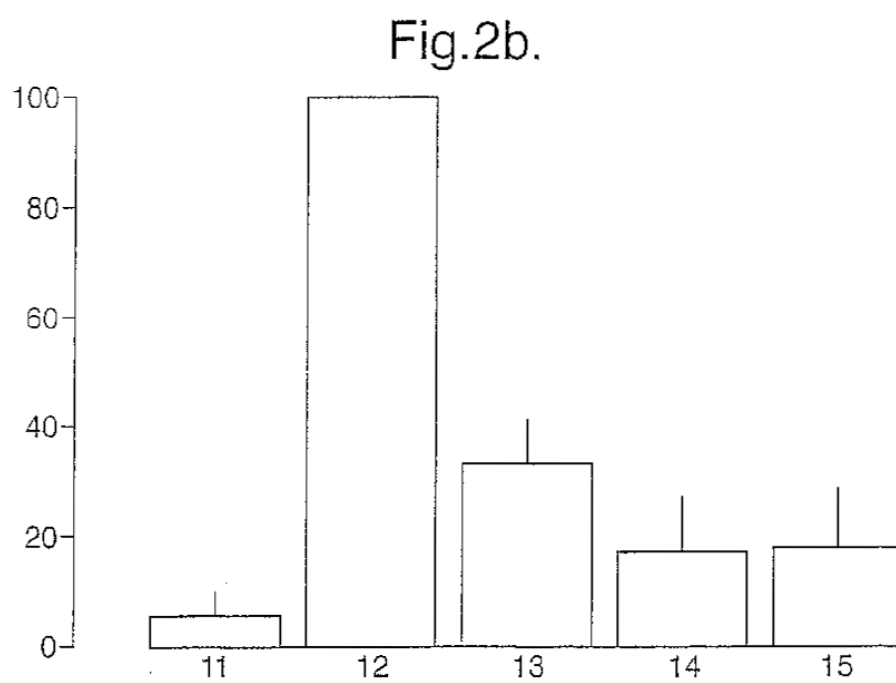
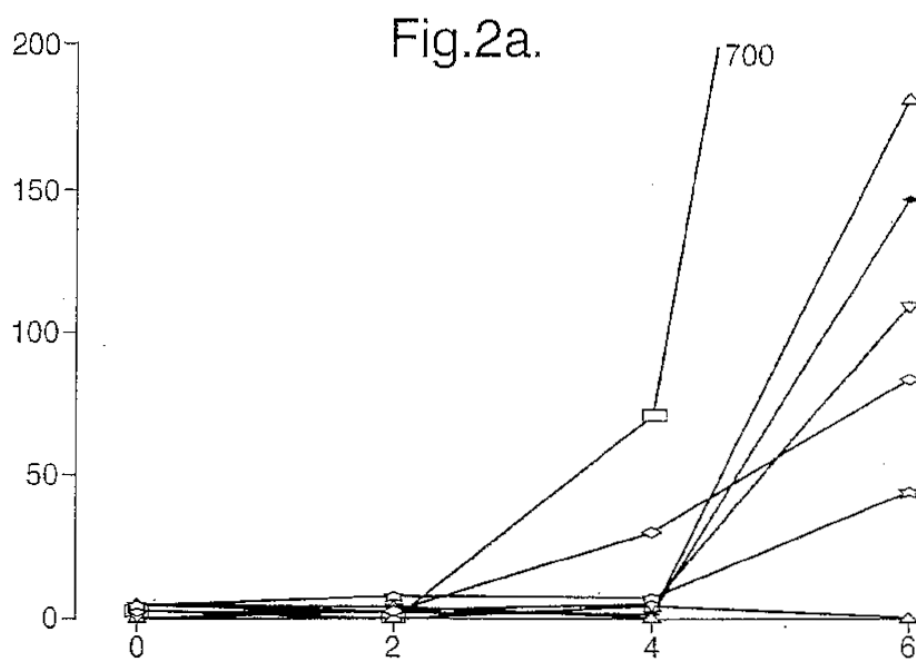




Fig.1b.





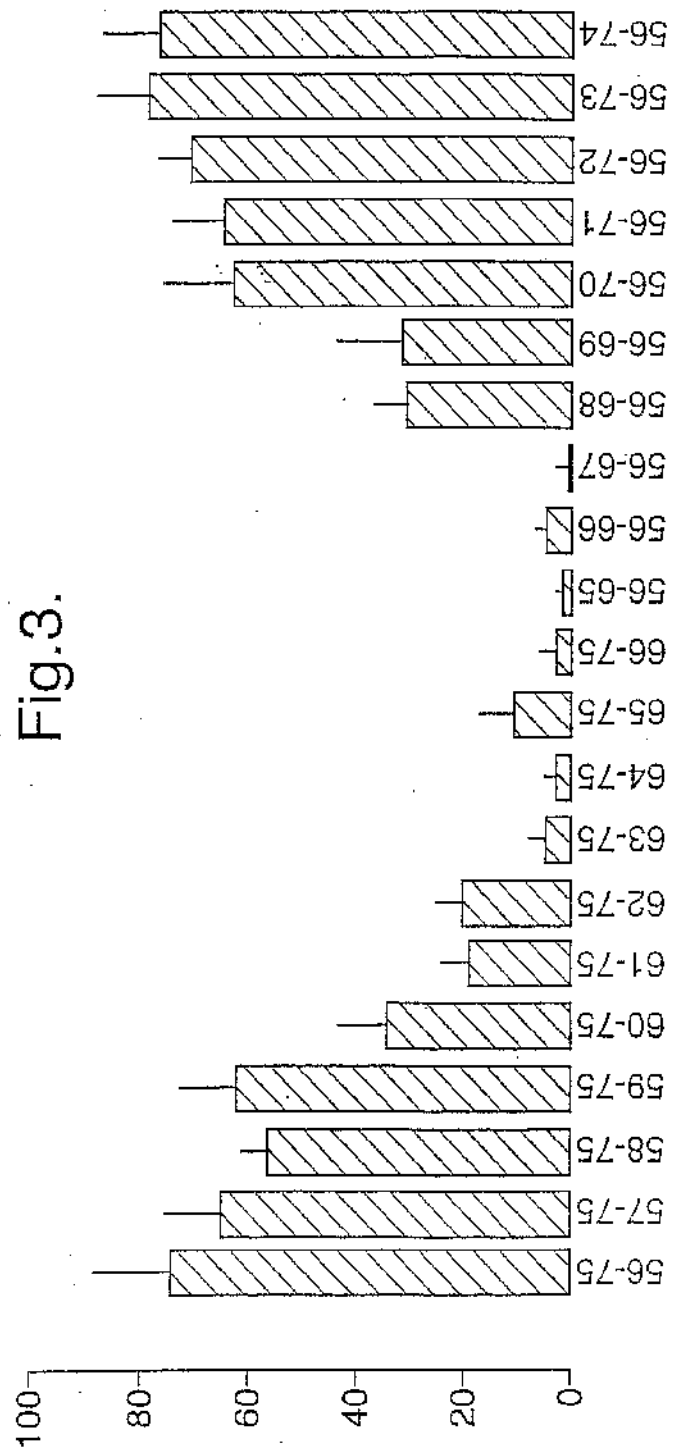


Fig.4a.

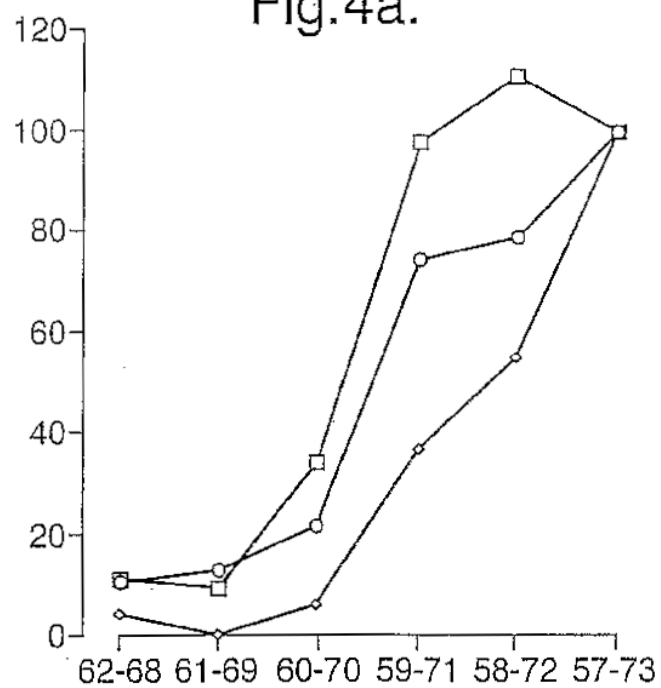


Fig.4b.

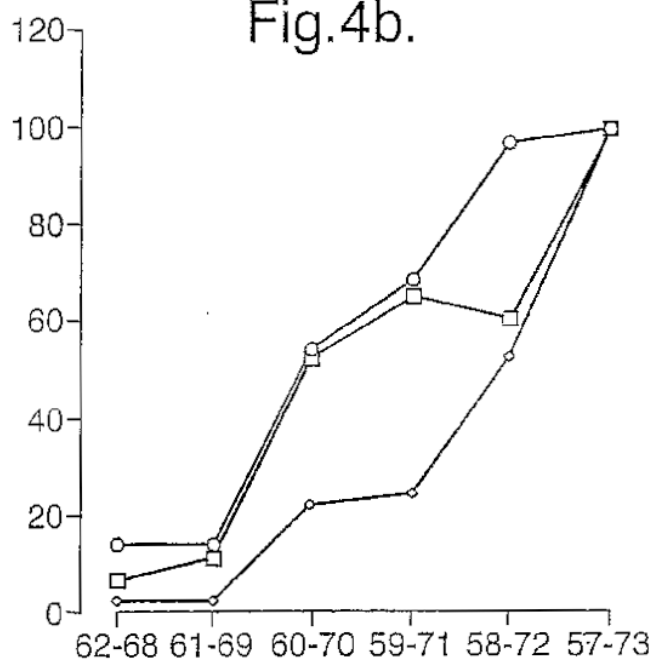


Fig.5.

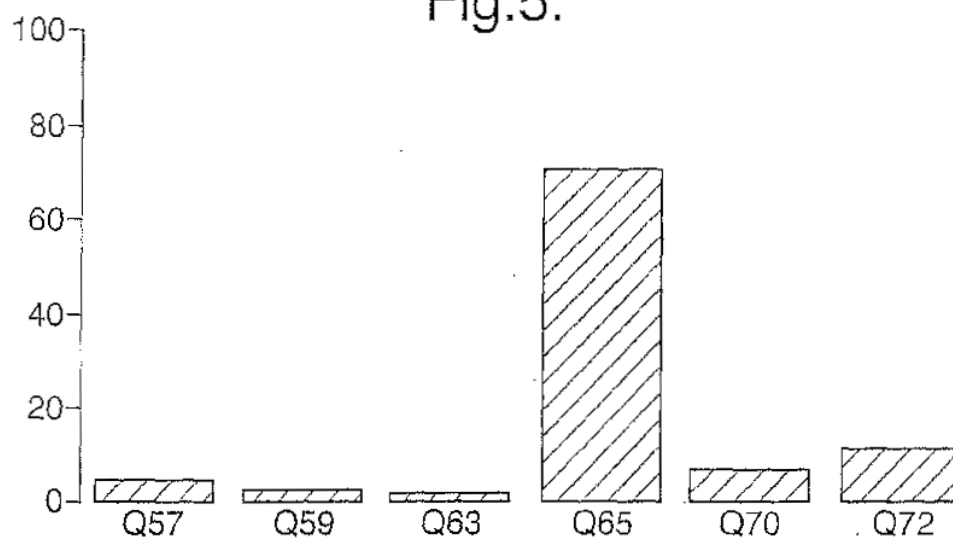


Fig.6

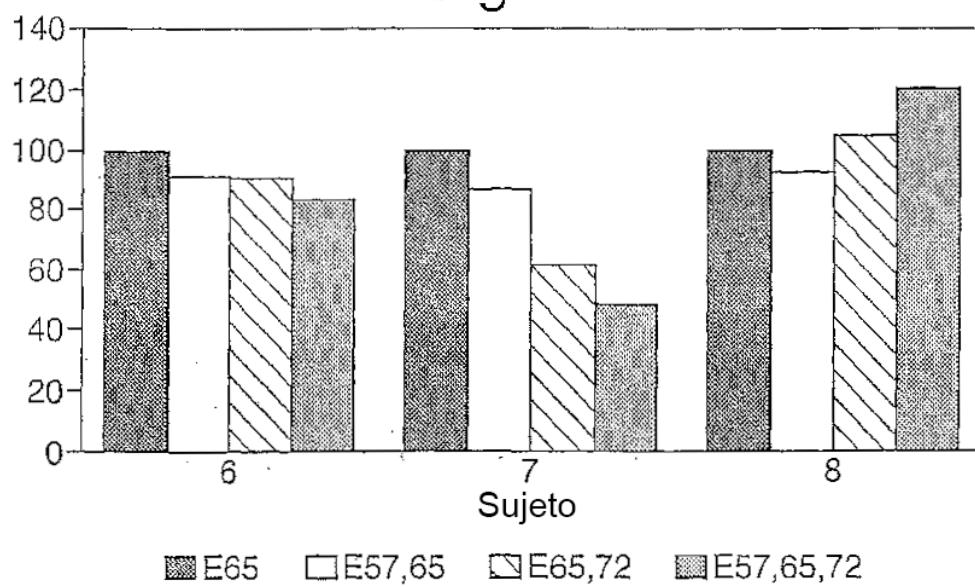


Fig.7a.

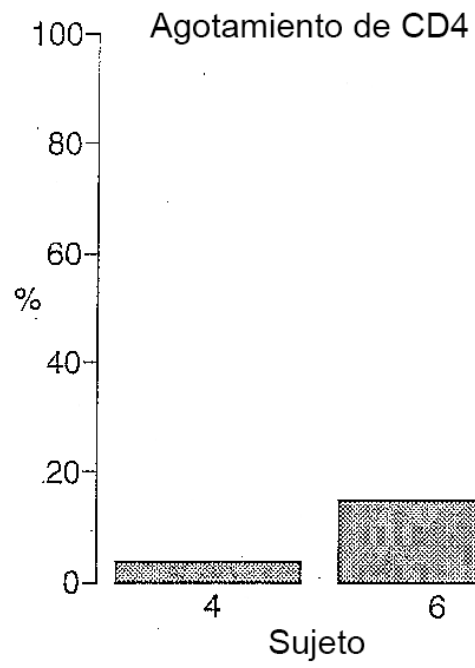
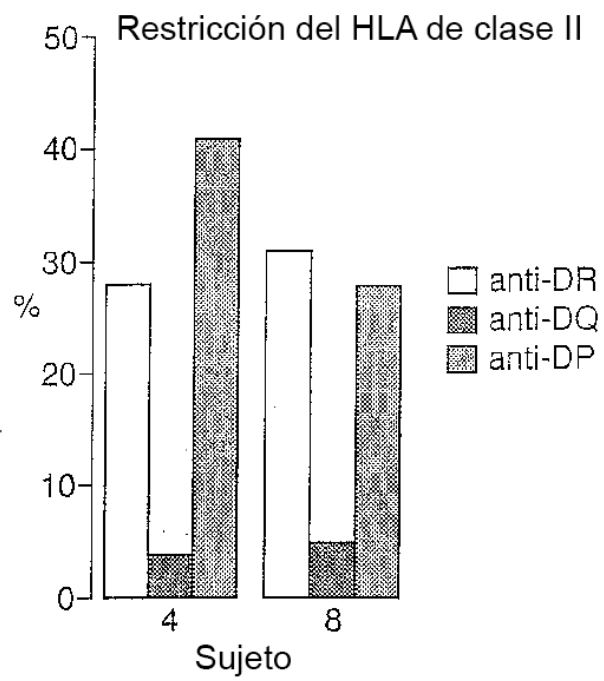
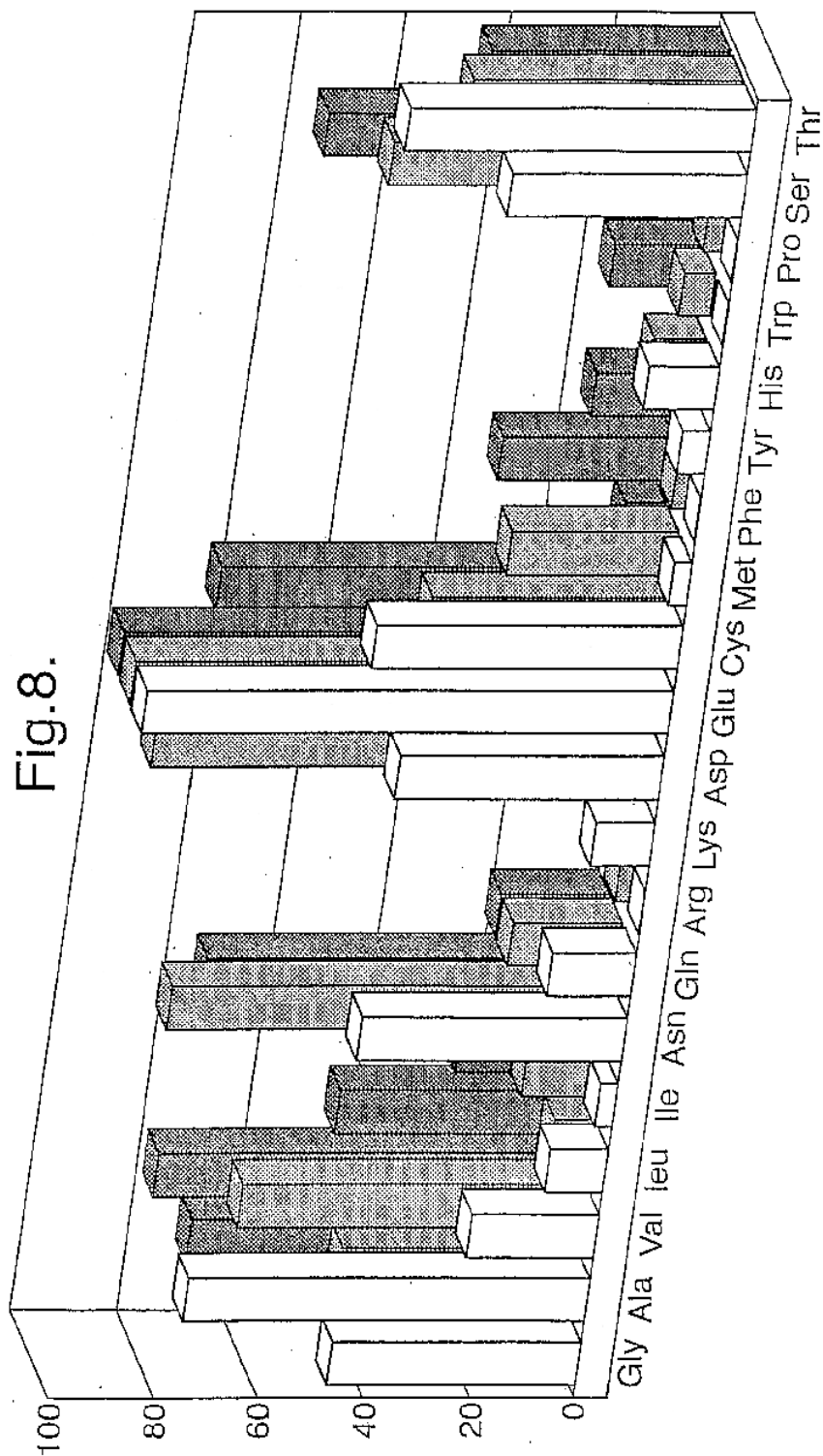


Fig.7b.





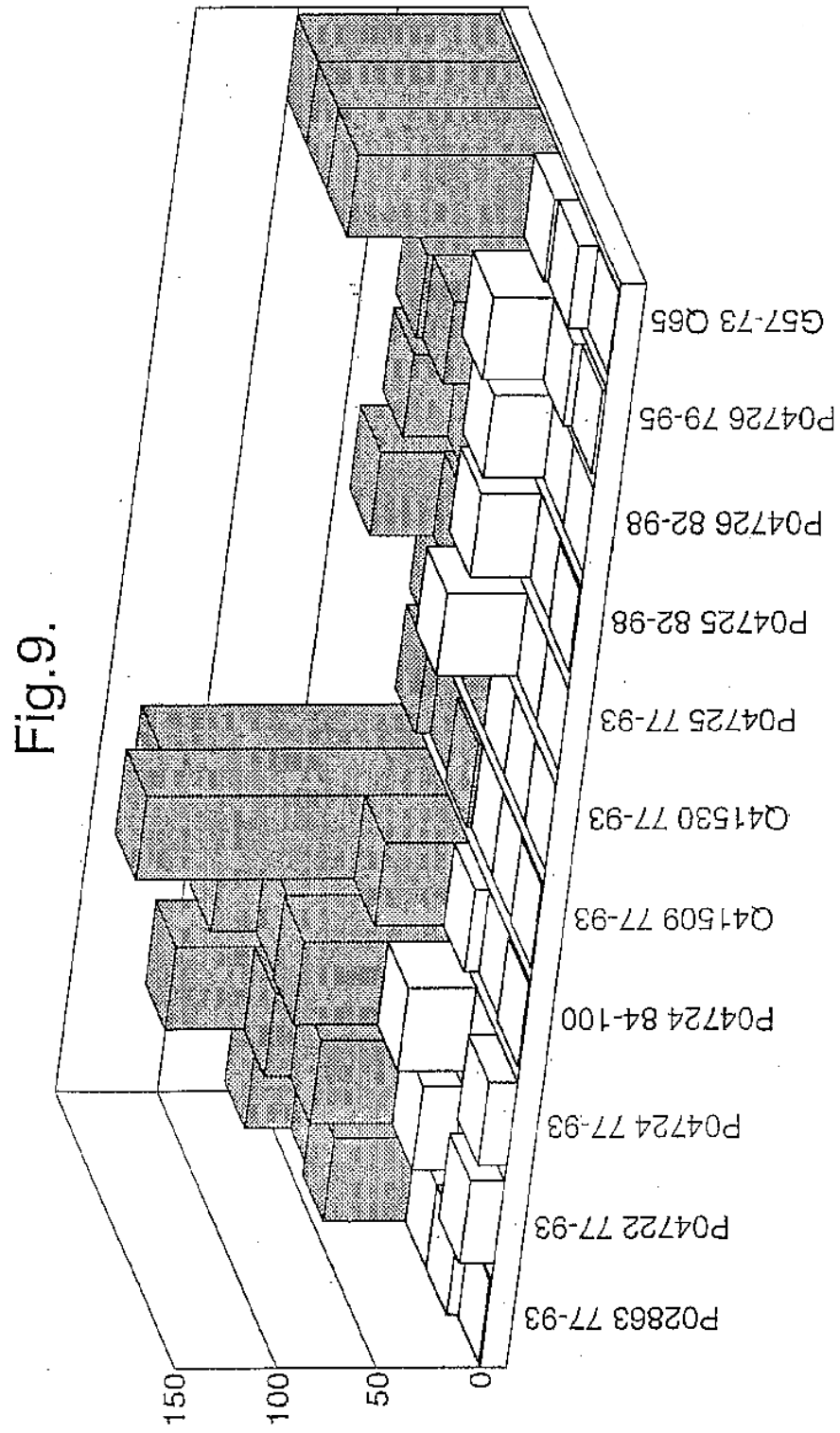
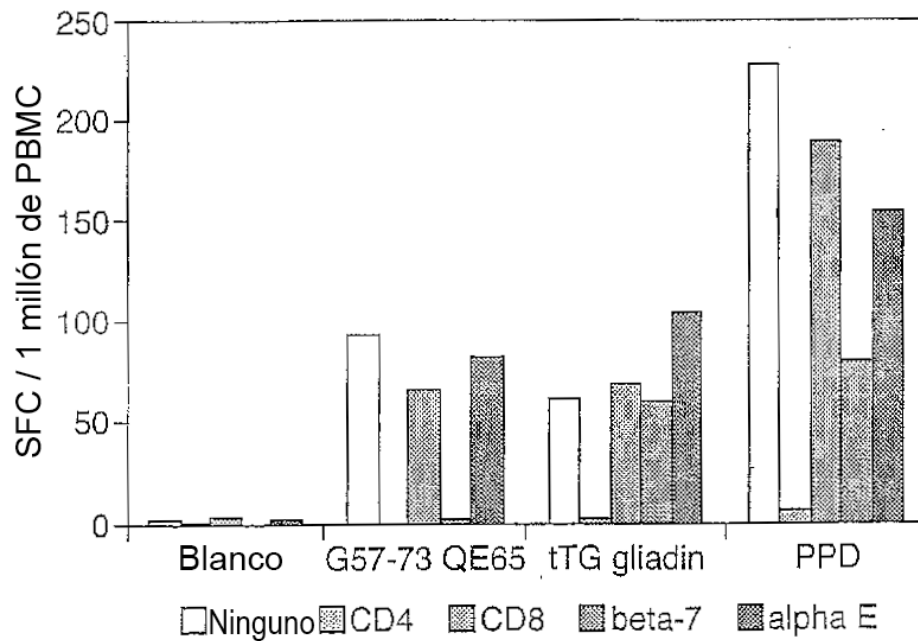
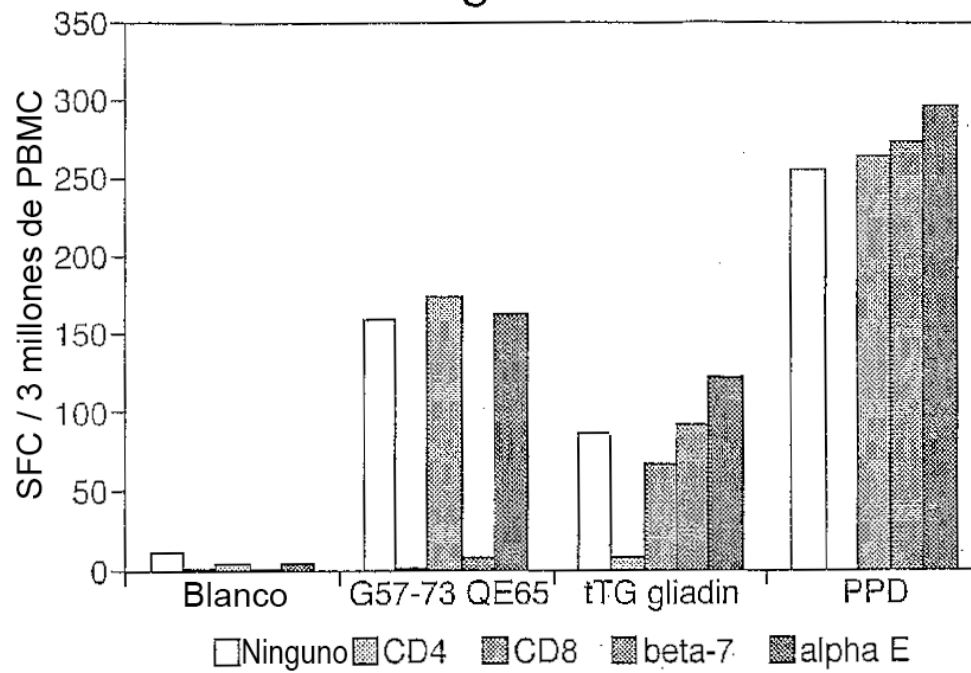


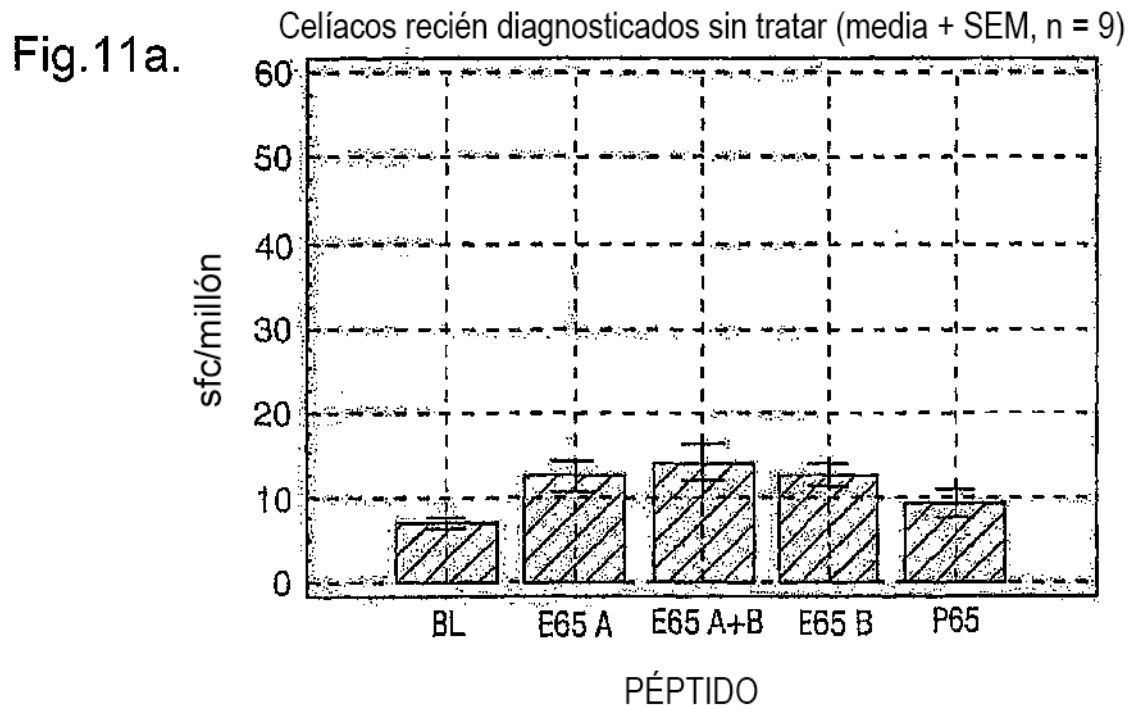


Fig.10.

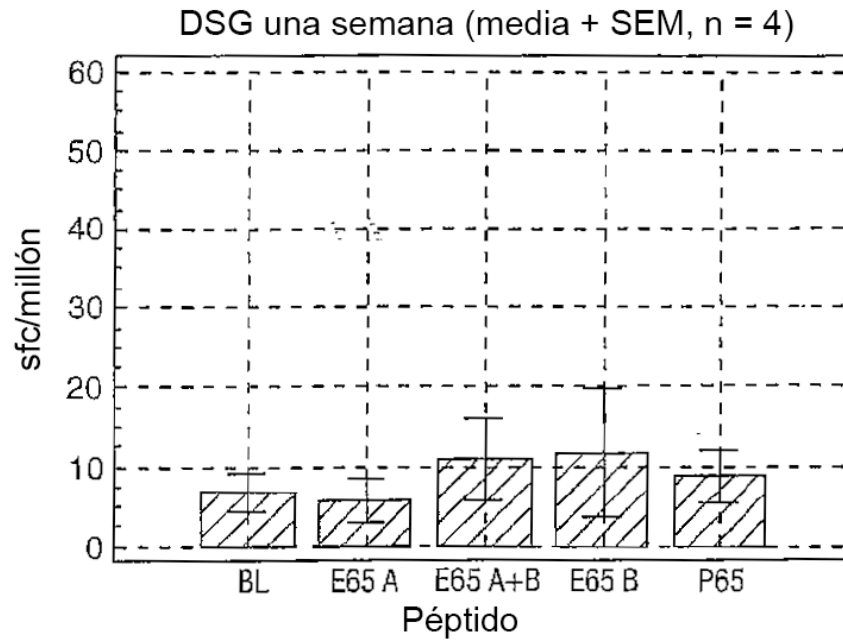


(Fig.11.)

Respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  en sujetos celíacos recién diagnosticados y tratados, antes y después de la exposición al gluten.

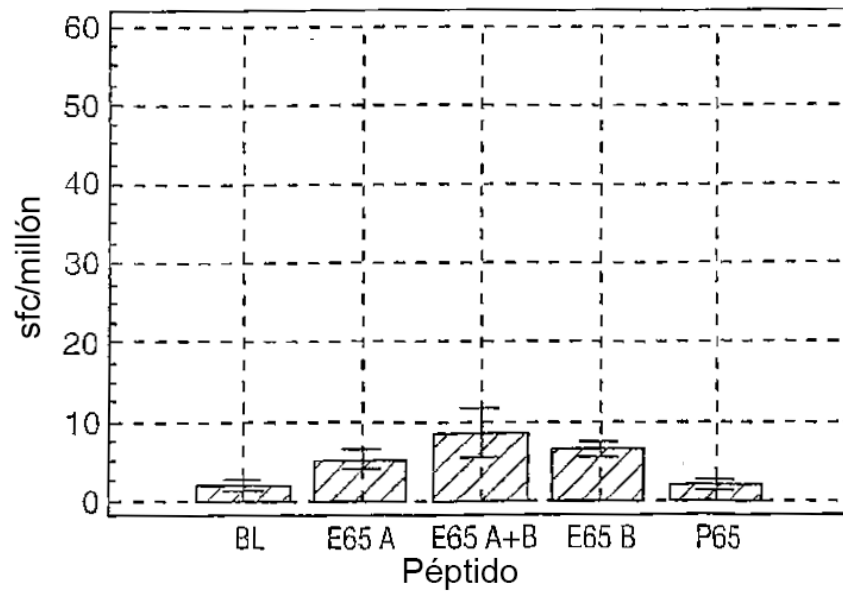


**Fig.11b.**

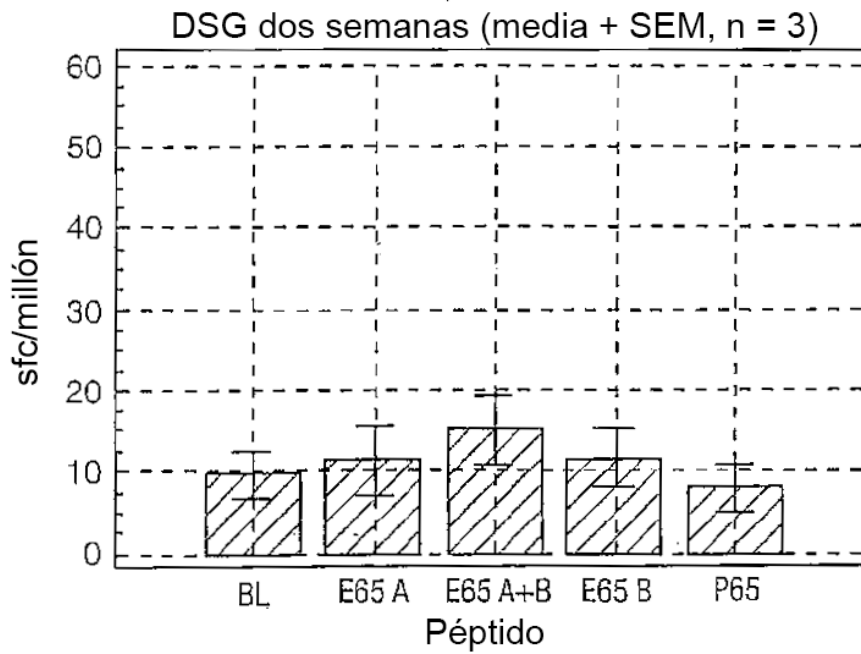


**Fig.11c.**

Día 6, exposición al gluten después de una semana de DSG (media + SEM, n = 4)

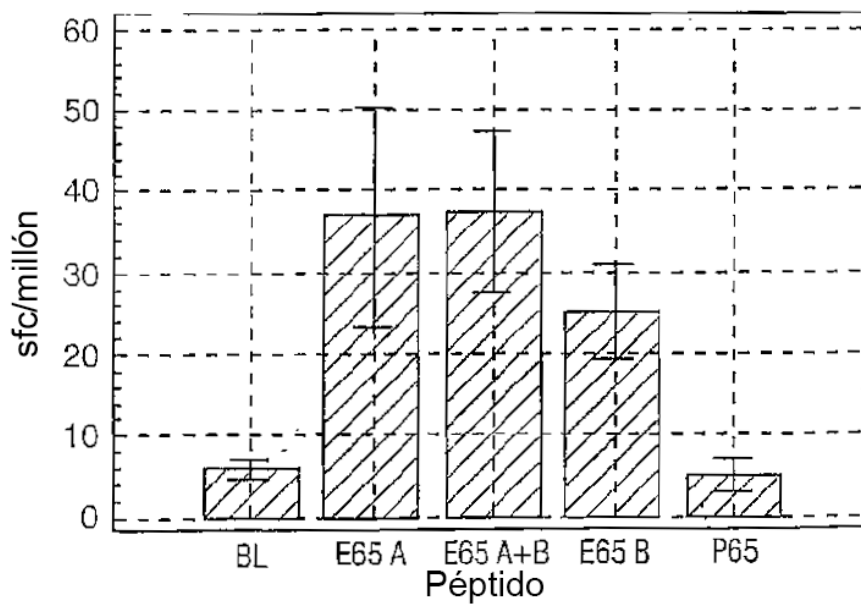


**Fig.11d.**



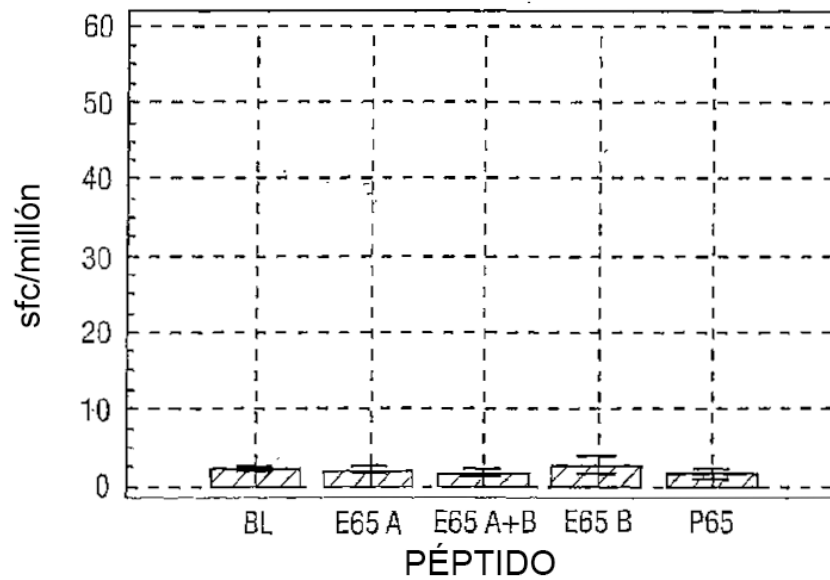
**Fig.11e.**

Día 6, exposición al gluten después de dos semanas de DSG (media + SEM, n = 3)



**Fig.11f.**

DSG dos meses (media + SEM, n = 3)



**Fig.11g.**

Día 6, exposición al gluten después de dos meses de DSG (media + SEM, n = 3)

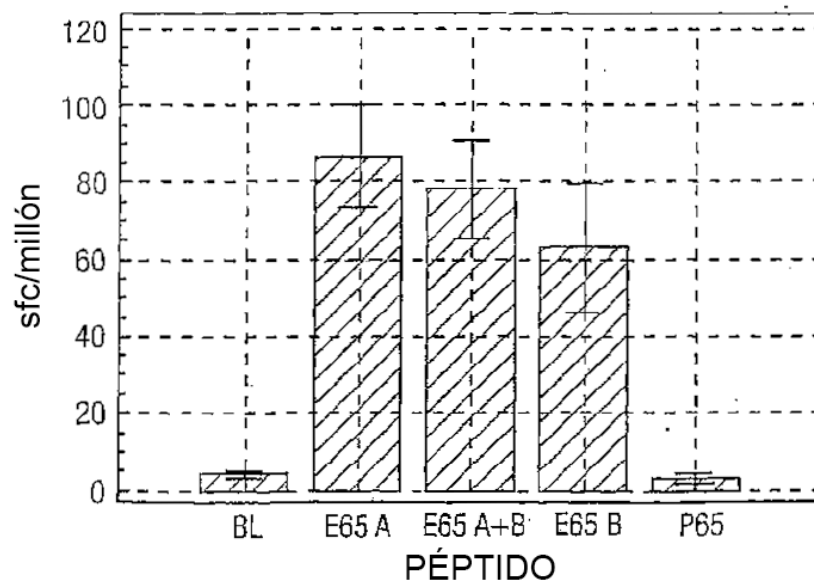
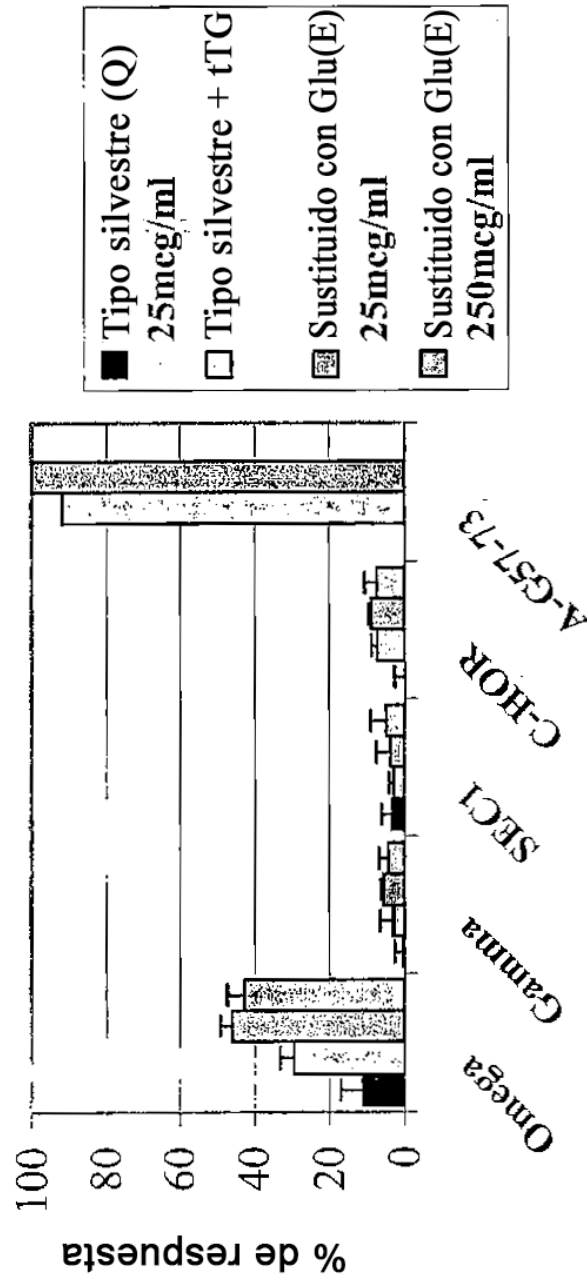


Figura 12. Bioactividad de homólogos de prolamina de A-gliadina 57-73 (ELISPOT para IFN- $\gamma$ , media + SEM, n = 6)



Omega: AAG17702 (141-157), Gamma: P21292 (96-112), SEC1: Q43639 (335-351), C-HOR: Q40055 (166-182). Los péptidos sustituidos con E se sintetizaron con E por Q en posición 9

Figura 13. Sujetos HLA-DQ2 sanos: cambio en las respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  a pools de péptidos de gliadina desamidados con tTG (cambio medio del día 0, n = 10)

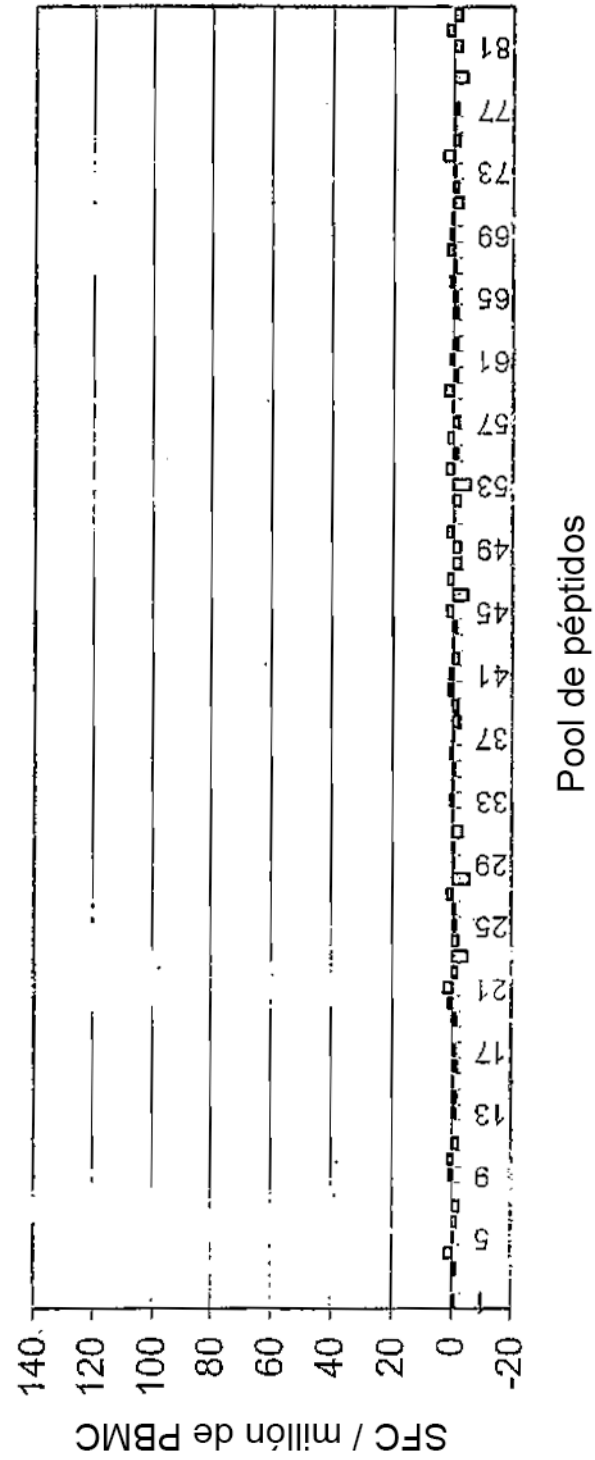


Figura 14. Sujetos HLA-DQ2 celíacos: cambio en las respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  a pools de péptidos de gliadina desamidados con tTG (cambio medio del día 0, n = 6)

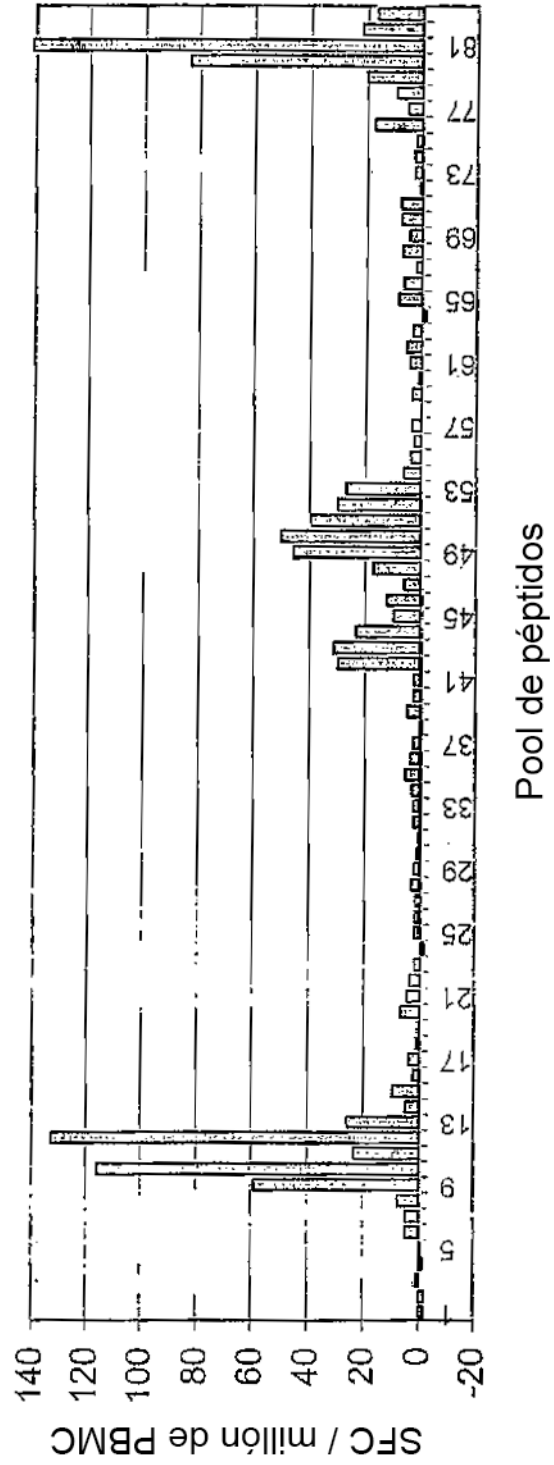




Figura 15. Contribuciones de los péptidos individuales a la respuesta "sumada" del péptido gliadina

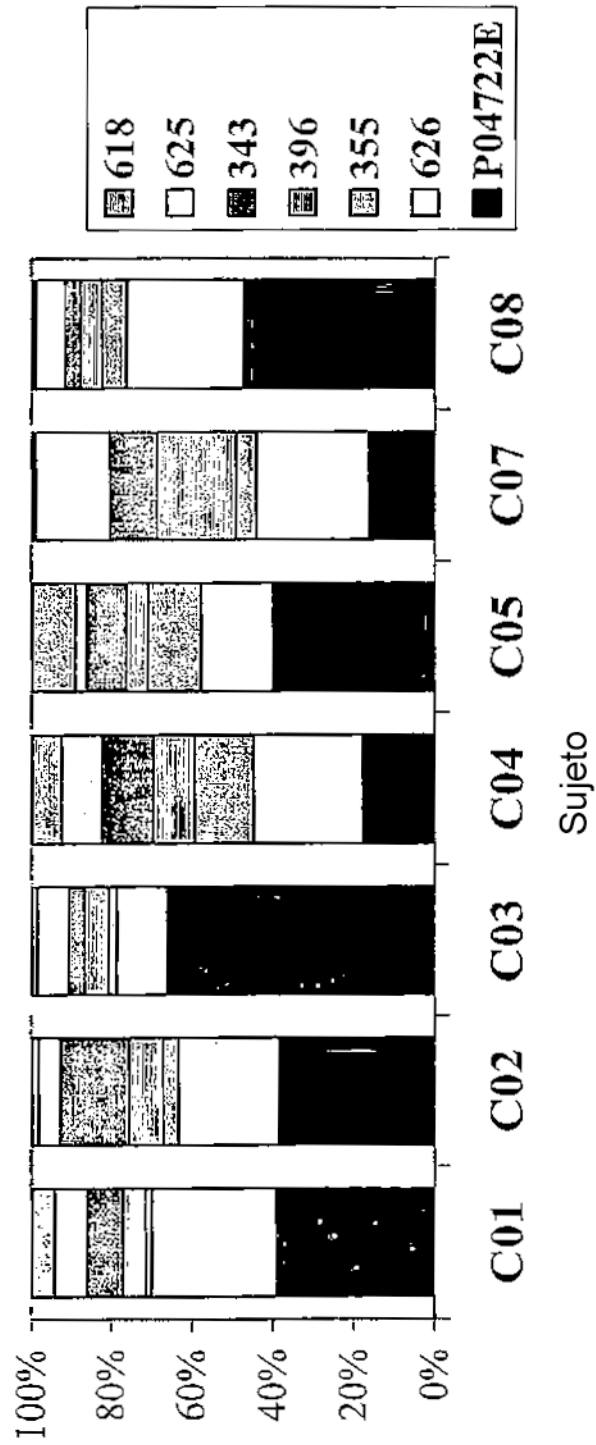


Figura 16. Sujeto celíaco C08 HLA-DQ2/8: Respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  inducidas por exposición a gluten para pools de péptidos de gliadina desamidados con tTG.

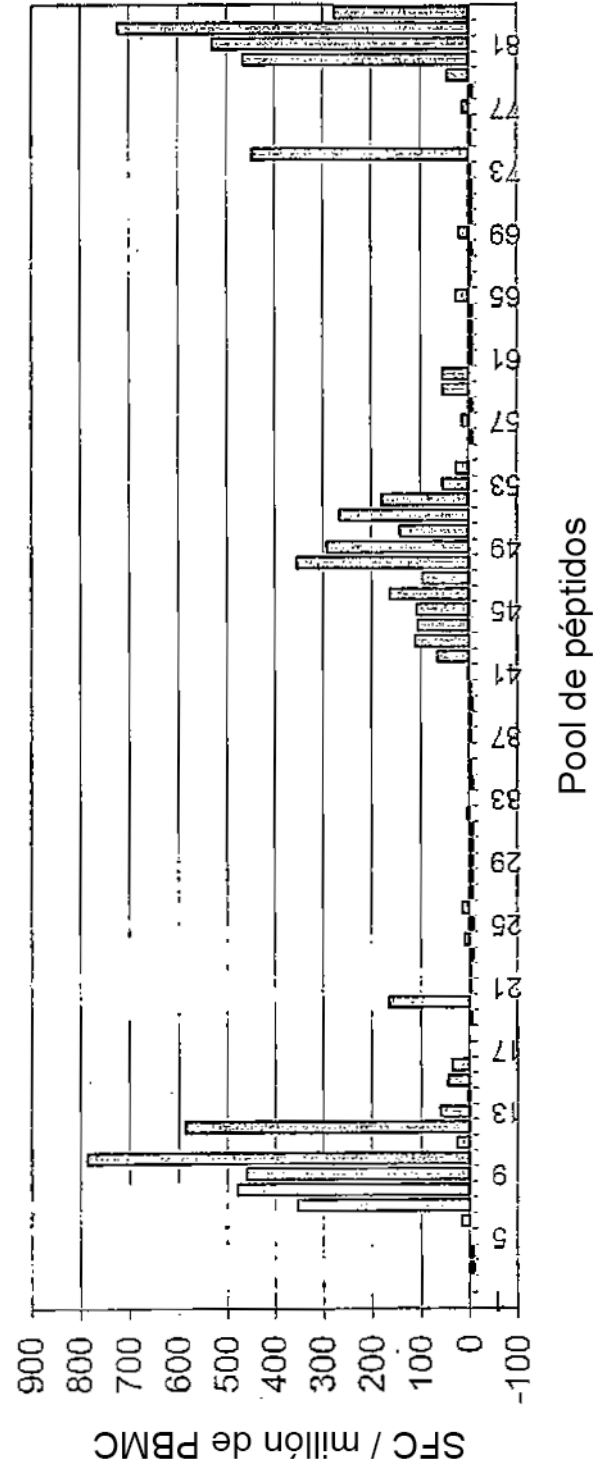


Figura 17. Sujeto celíaco C07 HLA-DQ2/8: Respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  inducidas por exposición a gluten para pools de péptidos de gliadina desamidados con tTG.

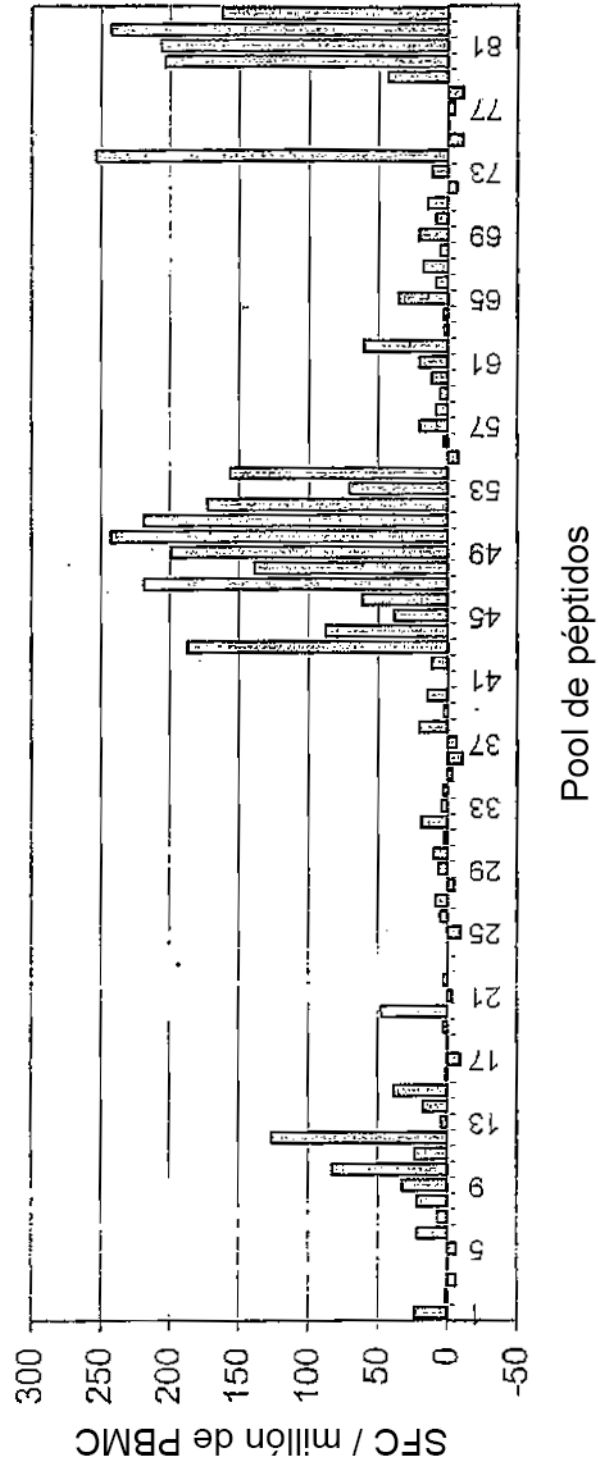


Figura 18. Sujeto celíaco C12 HLA-DQ8/7: Respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  inducidas por exposición a gluten para pools de péptidos de gliadina desamidados con tTG.

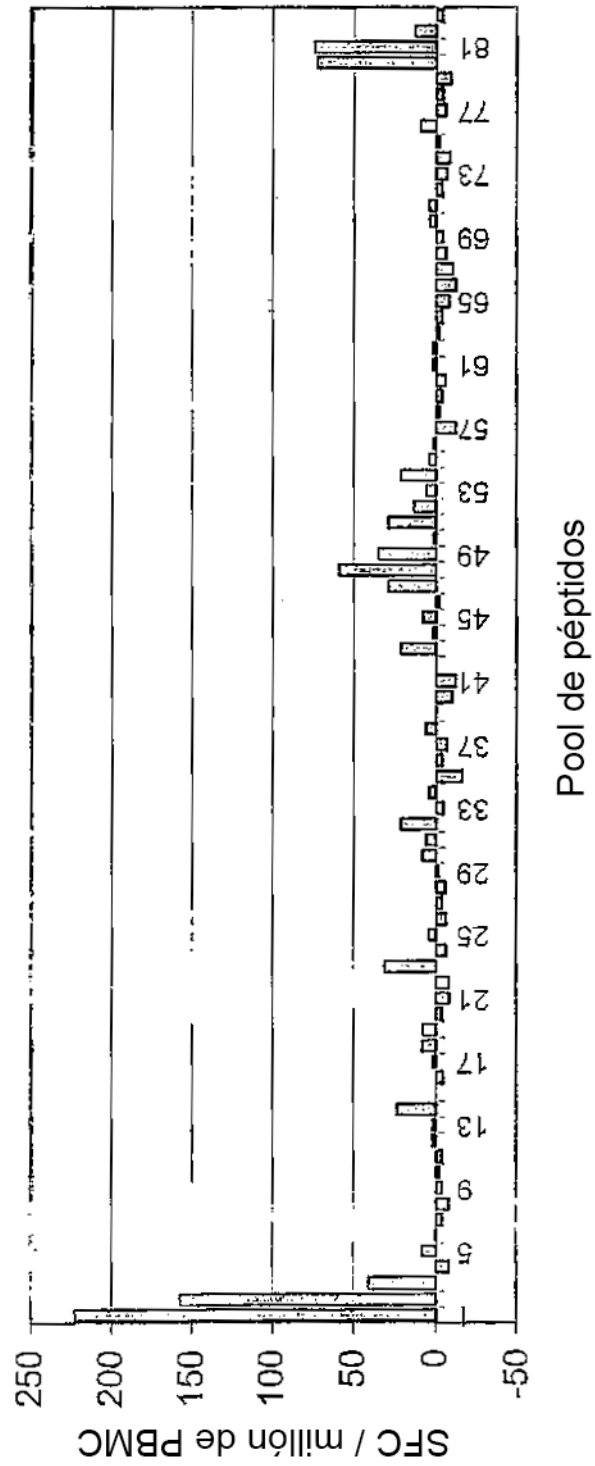


Figura 19. Sujeto celíaco C11 HLA-DQ6/8: Respuestas ELISPOT para IFN- $\gamma$  inducidas por exposición a gluten para pools de péptidos de gliadina desamidados con tTG.

