

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 481**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2009 E 09828453 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2367561**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedad celíaca**

30 Prioridad:

30.11.2008 US 118643 P

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

28.10.2015

73 Titular/es:

**IMMUSANT, INC. (100.0%)
One Kendall Square, Suite B2004
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, ROBERT PAUL;
STEWART, JESSICA ANNE;
DROMEY, JAMES ANTHONY y
TYE-DIN, JASON ALLAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 549 481 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedad celíaca

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento de un sujeto que es sensible al gluten, en particular a un sujeto que tiene enfermedad celíaca, y diagnóstico del mismo y ensayos y kits para su uso en el mismo.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad celíaca, también conocida como esprúe celíaco, afecta a aproximadamente el 1% de las personas en Europa y Norteamérica. En muchos de los afectados, la enfermedad celíaca no está reconocida, pero este descuido clínico se está rectificando ahora con mayor conciencia clínica. Una dieta sin gluten es el único tratamiento actual para la enfermedad celíaca, y debido a que la ingesta regular de tan poco como 50 mg de gluten (equivalente a 1 centésima de una rebanada de pan convencional) daña el intestino delgado, la inflamación crónica del intestino delgado es habitual en sujetos con una dieta sin gluten. Se ha mostrado que la inflamación persistente del intestino delgado aumenta el riesgo de cáncer, osteoporosis y muerte. Como el gluten se usa tan ampliamente, por ejemplo, en sopas comerciales, salsas, helados, etc., el mantenimiento de una dieta sin gluten es difícil.

15

20

La enfermedad celíaca se produce en individuos genéticamente susceptibles que poseen HLA-DQ2 codificado por HLA-DQA1*05 y HLA-DQB1*02 (que representan aproximadamente el 90% de los individuos), variantes de HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Dichos individuos montan una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4⁺ restringida a HLA-DQ2 y/o DQ8 inapropiada a péptidos derivados de proteínas insolubles acuosas de harina de trigo, gluten y proteínas relacionadas en el centeno y la cebada.

25

Todas las proteínas del gluten se consideran tóxicas en enfermedad celíaca. En el 2006, la base de datos pública del NCBI Genbank incluyó 345 entradas para proteínas del gluten de trigo panificable (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordein vulgare*) y centeno (*Secale cereale*).

30

Los enfoques predictivos han catalogado varios cientos de péptidos de gluten potencialmente "tóxicos" distintos basándose en búsquedas de homólogos de epítomos conocidos de clones de linfocitos T intestinales o de secuencias de gluten que se ha predicho o se ha demostrado que se unen con HLA-DQ2 *in vitro*, que tienen el motivo que favorece la desamidación por transglutaminasa tisular (tTG) y/o secuencias resistentes a proteólisis.

35

Revisiones acreditadas informan de que hay aproximadamente cincuenta epítomos de linfocitos T "inmunodominantes" en gluten relevantes para la enfermedad celíaca. Sin embargo, los linfocitos T inducidos contra hordeína o cebada aún no se han estudiado, y los epítomos de linfocitos T restringidos a HLA-DQ2 derivados de glutenina de alto peso molecular (HMW) aún no se han definido.

40

A pesar del gran número de péptidos de gluten implicados en la enfermedad celíaca, el de 33 unidades de α -gliadina resistente a proteasa LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEC ID N°: 1; α 2-gliadina 56-88) desamidado por tTG: LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEC ID N°: 2) se considera ampliamente el péptido estimulador óptimo (para líneas de linfocitos T intestinales inducidas contra gluten digerido por proteasa) en enfermedad celíaca asociada a HLA-DQ2. El subrayado de restos Q en SEC ID N°: 1, y a lo largo de la presente divulgación, indica un resto de glutamina susceptible de desamidación catalizada por tTG o coherente con el motivo de aminoácidos que predice susceptibilidad a desamidación por tTG, es decir, Q→E.

45

Este péptido de 33 unidades de α -gliadina (SEC ID N°: 1; α 2-gliadina 56-88) se recuperó de un producto de digestión de la α 2-gliadina recombinante, incorpora múltiples epítomos solapantes previamente identificados usando clones y líneas de linfocitos T intestinales, y también linfocitos T de sangre periférica nuevos de donantes HLA-DQ2⁺ afectados por enfermedad celíaca después de exposición a gluten *in vivo*. Estos epítomos incluyen DQ2- α -I: PFPQPQLPY (SEC ID N°: 3); DQ2- α -II: PQPELPYPQ (SEC ID N°: 4); y DQ2- α -III: PYPQPQLPY (SEC ID N°: 5). De hecho, la exposición a gluten *in vivo* en pacientes de enfermedad celíaca HLA-DQ2⁺ induce linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica que son específicos para una única secuencia de 11 unidades en la secuencia de proteína α -gliadina, p60-70 PFPQPQLPYQPQ (SEC ID N°: 6), que es óptimamente bioactiva cuando está flanqueada por tres restos adicionales en los extremos tanto N como C terminales, α -gliadina p57-73 QLQFPQPQLPYQPQPS (SEC ID N°: 7) y desamidada por tTG o Q65 que sustituye glutamato, α -gliadina p57-73 QE65 QLQFPQPQLPYQPQPS (SEC ID N°: 8) que incluye DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y DQ2- α -II (SEC ID N°: 4). Sin embargo, hay cientos de proteínas del gluten de trigo, centeno y cebada, y los epítomos de DQ2- α -I, DQ2- α -II y DQ2- α -III representan juntos típicamente no más de la mitad de las propiedades estimulantes de linfocitos T tóxicas del gluten en enfermedad celíaca HLA-DQ2⁺. Se desvelan epítomos adicionales relevantes para la enfermedad celíaca en los documentos WO 01/25793, WO 03/104273 y WO 05/105129.

50

55

60

65

Aunque no se ha inducido linfocitos T contra hordeína de cebada o secalina de centeno, proteínas estrechamente relacionadas con el gluten del trigo, la toxicidad de la cebada y el centeno se atribuyen a linfocitos T específicos para epítomos en el gluten del trigo, especialmente DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) o DQ2- α -II (SEC ID N°: 4), que son reactivos de forma cruzada con secuencias de hordeína y secalina relacionadas desamidadas por tTG, en particular PFPQPQQPF (SEC ID N°: 9) desamidada a H α 9/S α 9 PFPQPEQPF (SEC ID N°: 10; DQ2-G ω -I) o PQPQQPFPQ (SEC ID N°: 11) desamidada a H α 2/S α 2 PQPEQFPQ (SEC ID N°: 12), respectivamente.

Entre las autoridades en este campo, hay desacuerdo con respecto a la dominancia, jerarquía y redundancia de péptidos particulares en la inducción de la estimulación de linfocitos T en enfermedad celíaca.

El entendimiento de la uniformidad y contribución relativa de péptidos particulares a la capacidad estimulante de linfocitos T de gluten tiene su aplicación. Siempre que representen uniformemente una proporción sustancial de la respuesta de linfocitos T al gluten, los péptidos estimulantes de linfocito T dominantes podrían por sí solos colectivamente permitir el desarrollo de productos terapéuticos y de diagnóstico específicos de antígeno.

En principio, la terapia específica de antígeno es una estrategia atractiva para tratar enfermedades autoinmunitarias y alérgicas. Los enfoques basados en proteína completa para desensibilización son eficaces para afecciones alérgicas humanas y también el tratamiento y la prevención de autoinmunidad y rechazo de aloinjertos en modelos animales experimentales, sin embargo, la aplicación más amplia de terapia específica de antígenos basada en proteínas se ha limitado por el riesgo bajo pero reconocido de anafilaxis y porque los antígenos relevantes pueden no ser adecuados como productos farmacéuticos o simplemente no se entienden con suficiente detalle para permitir el desarrollo farmacéutico.

El riesgo de anafilaxis puede minimizarse y los problemas de formulación superarse usando péptidos lineales cortos, solubles acuosos, que abarcan secuencias del antígeno relevante para la enfermedad reconocido por linfocitos T CD4⁺ patógenos. Las vacunas terapéuticas basadas en péptidos son eficaces en modelos de ratón endogámicos de autoinmunidad y rechazo de aloinjertos en los que se definen epítomos inmunodominantes relevantes y sus linfocitos T CD4⁺ afines. Sin embargo, incluso para enfermedades inmunitarias humanas fuertemente asociadas con HLA, la identificación de epítomos de linfocitos T CD4⁺ patógenos con suficiente confianza para apoyar un diseño racional de fármacos y desarrollo farmacéutico ha sido muy limitada.

En muchos casos, esta incertidumbre se debe al hecho de que las respuestas de linfocitos T indicadas en pacientes están en los límites de la detección, dependen habitualmente de la expansión *in vitro* que puede ser respuestas de linfocitos T primarios o de recuerdo, y pueden con frecuencia también encontrarse en individuos de HLA coincidentes sanos. Estos restos técnicos han dado como resultado la solución intermedia de que la selección peptídica para vacunas terapéuticas tiende a basarse en afinidad de unión *in vitro* para moléculas de HLA relevantes para la enfermedad, en lugar de su definición inequívoca como epítomos para linfocitos T patógenos inmunodominantes. Una consecuencia adicional es que los compuestos basados en péptidos diseñados de esta manera tienen a abarcar un cóctel de péptidos consumido. Podría esperarse que cuanto mayor sea el cóctel, mayor será la probabilidad de que aparezcan dificultades en la formulación, estabilidad y efectos adversos, pero también es más probable que los linfocitos T específicos para péptidos en el cóctel realicen uniformemente una contribución sustancial a la respuesta de linfocitos T patógena en pacientes.

Dado el gran número de péptidos de gluten tóxicos, los inventores han intentado identificar un conjunto óptimo no redundante de péptidos inmunodominantes del que podría seleccionarse una mezcla mínima para su uso en inmunoterapia basada en péptidos capaz de modular la respuesta inmunitaria de un individuo al gluten. Los inventores han intentado identificar péptidos inmunodominantes útiles en el tratamiento de enfermedad celíaca modificando específicamente la respuesta de linfocitos T patógena al gluten y proporcionar por lo tanto una vacuna eficaz contra la enfermedad celíaca. La misma mezcla de péptidos también es útil en el diagnóstico y control de productos terapéuticos inmunomoduladores en enfermedad celíaca.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han identificado tres péptidos estimulantes de linfocitos T dominantes que juntos pueden usarse como un agente en una inmunoterapia o vacuna para modular la respuesta de linfocitos T a tres o más péptidos del gluten y para proporcionar tolerancia al gluten, permitiendo el tratamiento de la enfermedad celíaca. En consecuencia, en un aspecto la presente invención proporciona un agente que comprende

- i) un primer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos LQFPQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 13), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo,
- ii) un segundo péptido que comprende la secuencia de aminoácidos QFPQPEQPFPWQP (SEC ID N°: 14), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y
- iii) un tercer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos PEQPIEQPQPYPQQ (SEC ID N°: 16), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.

- 5 SEC ID N°: 13 (LQFPQPELPYPQPQ) abarca dos epítomos solapantes, PFPQPELPY (SEC ID N°: 3) y PQPELPYPQ (SEC ID N°: 4), SEC ID N°: 14 (QFPQPEQFPWQP) abarca dos epítomos solapantes, PFPQPEQPF (SEC ID N°: 10) y PQPEQFPW (SEC ID N°: 15; DQ2- ω -II), y SEC ID N°: 16 PEQPIEQPQPYPQQ abarca el epítomo PIPEQPYPY (SEC ID N°: 17; DQ2-Hor-I) y también el epítomo predicho EQPIEQPQ (SEC ID N°: 18) intercambiable con QQPIEQPQ (SEC ID N°: 19).
- 10 En una realización, los primer, segundo y/o tercer péptidos comprenden un grupo acetilo N terminal o grupo piroglutamato y/o un grupo amida C terminal. Más preferentemente, los primer, segundo y/o tercer péptidos comprende un grupo piroglutamato N terminal y un grupo amida C terminal.
- 15 En una realización adicional, los primer, segundo y/o tercer péptidos se conjugan con un compuesto. Los ejemplos de compuestos adecuados incluyen, pero sin limitación, un adyuvante y una molécula de MHC o fragmento de unión de la misma.
- 20 En una realización preferida, cada péptido se proporciona como una molécula separada. Sin embargo, en una realización alternativa, dos o tres de los primer, segundo y tercer péptidos, o fragmento biológicamente activo o variante de uno o más de los mismos, están en una única cadena polipeptídica.
- 25 En una realización adicional, el agente comprende uno o más péptidos adicionales que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 95, 102, 103, 104, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 209, 210, o un fragmento biológicamente activo o variante de uno cualquiera de los mismos.
- 30 Los péptidos adicionales permiten un grupo de tratamiento eficaz más amplio y mayor amplitud de tratamiento o diagnóstico. Particularmente, el uso de péptidos adicionales puede aumentar la probabilidad de que el agente pueda anular la inflamación o el daño de respuesta a ingesta de gluten y permitir que un sujeto con enfermedad celíaca tenga una dieta normal. Adicionalmente, cuando el agente se usa como un diagnóstico, es ventajoso tener más dianas y esto se consigue proporcionando más péptidos que podrían estar en su forma desamidada o de tipo silvestre de la lista SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 95, 102, 103, 104, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 209, 210.
- 35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un agente que comprende uno o más polinucleótidos que codifican
- 40 i) un primer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos LQFPQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 13), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo,
- ii) un segundo péptido que comprende la secuencia de aminoácidos QFPQPEQFPWQP (SEC ID N°: 14), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo,
- iii) un tercer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos PEQPIEQPQPYPQQ (SEC ID N°: 16), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y
- 45 iv) opcionalmente uno o más péptidos adicionales que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 95, 102, 103, 104, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 209, 210, o un fragmento biológicamente activo o variante de uno cualquiera o más de los mismos.
- 50 El o los péptidos, o fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos, pueden codificarse por uno o más polinucleótidos. Por lo tanto, al menos algunos del o los péptidos, o fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos, pueden transcribirse y traducirse a partir de un único polinucleótido como una única cadena polipeptídica.
- 55 El agente también puede ser una mezcla de péptidos y polinucleótidos. Por lo tanto, en un aspecto adicional la presente invención proporciona un agente que comprende
- 60 i) un primer péptido como se define en el presente documento o un polinucleótido para el mismo,
- ii) un segundo péptido como se define en el presente documento o un polinucleótido para el mismo, y
- iii) un primer péptido como se define en el presente documento o un polinucleótido para el mismo. Como apreciará el experto en la materia, uno o más de los péptidos pueden ser un fragmento biológicamente activo o variante de la secuencia peptídica definida.
- 65 En otro aspecto, la presente invención proporciona un péptido sustancialmente purificado y/o recombinante que comprende, más preferentemente que consiste en, una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera o más de SEC ID N°: 16, 69, 73, 75, 78, 80, 87, 91, 92, 95, 96, 98, 100, 104, 107, 113, 116, 117, 123,

138, 144, 147, 149, 153, 155, 156, 159, 161, 163, 165, 179, 181, 185, 187, 189, 195, 196, 198, 202, 204, 205, 207, 209, 215 o 223, o un fragmento biológicamente activo o variante de uno cualquiera adicional o más de los mismos. En una realización preferida de este aspecto, el péptido es de 19 aminoácidos de longitud o menos.

- 5 En una realización preferida adicional del aspecto anterior, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos PEQPIPEQPQPYPQQ (SEC ID N°: 16), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.

En un aspecto adicional, se proporciona un polinucleótido aislado y/o exógeno que codifica al menos un péptido de la invención.

- 10 En un aspecto adicional, se proporciona una vacuna que comprende un agente de la invención, un péptido de la invención y/o un polinucleótido de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la vacuna comprende un adyuvante.

- 15 En otro aspecto, se proporciona una célula presentadora de antígenos aislada que comprende un agente de la invención, un péptido de la invención y/o un polinucleótido de la invención. Los ejemplos de células presentadoras de antígenos útiles para la invención incluyen, pero sin limitación, una célula dendrítica, macrófago, linfocito B o una célula endotelial sinusoide del hígado. En una realización preferida, la célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.

- 20 En un aspecto, se proporciona un método para modular una respuesta a linfocitos T a un péptido de gluten en un sujeto que es sensible al gluten, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente de la invención, el péptido de la invención, el polinucleótido de la invención, la vacuna de la invención y/o la célula presentadora de antígenos de la invención.

- 25 En otro aspecto, se proporciona un método para inducir tolerancia inmunitaria a un péptido de gluten en un sujeto que es sensible al gluten, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente de la invención, el péptido de la invención, el polinucleótido de la invención, la vacuna de la invención y/o la célula presentadora de antígenos de la invención.

- 30 En un aspecto adicional, se proporciona un método para tratar la enfermedad celíaca, comprendiendo el método administrar a un sujeto que es sensible al gluten una cantidad eficaz del agente de la invención, el péptido de la invención, el polinucleótido de la invención, la vacuna de la invención y/o la célula presentadora de antígenos de la invención.

- 35 En otro aspecto más, se proporciona un método para modificar la secreción de citocinas en un sujeto que es sensible al gluten, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente de la invención, el péptido de la invención, el polinucleótido de la invención, la vacuna de la invención y/o la célula presentadora de antígenos de la invención.

En una realización, se reduce la secreción de interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN γ) y/o factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). En otra realización, se aumenta la secreción de interleucina 10 (IL-10).

- 40 También se proporciona el uso del agente de la invención, el péptido de la invención, el polinucleótido de la invención, la vacuna de la invención y/o la célula presentadora de antígenos de la invención para la fabricación de un medicamento para modular una respuesta de linfocitos T, inducir tolerancia inmunitaria, tratar la enfermedad celíaca y/o modificar la secreción de citocinas, en un sujeto que es sensible al gluten.

- 45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para diagnosticar enfermedad celíaca en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una muestra del sujeto con el agente de la invención, el péptido de la invención y/o la vacuna de la invención y determinar *in vitro* si uno o más de los péptidos definidos en el presente documento se unen con linfocitos T en la muestra, en el que la unión de uno o más de los péptidos con linfocitos T indica que el sujeto tiene, o es susceptible de, enfermedad celíaca.

- 50 También se proporciona el uso del método de diagnóstico anterior para controlar la progresión de enfermedad celíaca y/o para determinar la eficacia de un método que implica administrar al sujeto que es sensible al gluten una cantidad eficaz del agente de la invención, el péptido de la invención, el polinucleótido de la invención y/o la célula presentadora de antígenos de la invención.

- 55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para llevar a cabo el método de diagnóstico anterior, comprendiendo el kit el agente de la invención, el péptido de la invención y/o la vacuna de la invención, y medios para detectar la unión de uno o más de los péptidos con linfocitos T. El kit también puede incluir instrucciones para su uso. El kit también puede comprender medios para detectar el reconocimiento del agente por linfocitos T.

60

65

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir la célula presentadora de antígenos de la invención, comprendiendo el método

i) obtener una célula presentadora de antígenos y

5 ii) poner en contacto la célula *in vitro* con el agente de la invención, el péptido de la invención, el polinucleótido de la invención y/o la vacuna de la invención.

También se proporciona el uso del agente de la invención, el péptido de la invención, el polinucleótido de la invención, la vacuna de la invención y/o la célula presentadora de antígenos de la invención en diagnóstico o terapia.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una vacuna de la invención, comprendiendo el método combinar los primer, segundo y tercer péptidos, y opcionalmente uno o más péptidos adicionales seleccionados del grupo que consiste en SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 95, 102, 103, 104, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 15 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 209, 210, o un fragmento biológicamente activo o variante de una cualquiera o más de las mismas, con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar si una composición o alimento es capaz de causar enfermedad celíaca, comprendiendo el método detectar la presencia del agente de la invención, el péptido de la invención y/o el polinucleótido de la invención en la composición o una muestra de alimento.

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para identificar una proteasa que puede escindir un péptido como se define en el presente documento, comprendiendo el método poner en contacto el péptido con una proteasa en condiciones para efectuar la escisión específica del péptido para producir un producto proteolítico y detectar el producto proteolítico producido.

30 En otro aspecto, se proporciona un método para mejorar la semivida y/o biodisponibilidad de un péptido cuando se administra a un sujeto, comprendiendo el método modificar el extremo N terminal del péptido para incluir un acetilo o piroglutamato N terminal y modificar el extremo C terminal del péptido para incluir una amida C terminal.

En una realización, el péptido es para administrar a un sujeto para inducir tolerancia inmunitaria.

35 Como resultará evidente, los elementos y características preferidos de un aspecto de la invención son aplicables a muchos otros aspectos de la invención.

40 A lo largo de la presente memoria descriptiva se entenderá que la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

La invención se describe en lo sucesivo en el presente documento por medio de los siguientes Ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras adjuntas.

45 Breve descripción de los dibujos

50 **Figura 1:** muestra las frecuencias relativas de linfocitos T específicos de péptidos de gluten detectados por ELISpot de IFN γ en PBMC recogidas el día 6 después de que los donantes de enfermedad celíaca HLA-DQ2⁺ comiencen la exposición a trigo frente a polimorfismos de α -gliadina 57-73 y α -gliadina 57-73 QE65 (SEC ID N°: 7 y 8, respectivamente).

Figura 2: muestra las respuestas de ELISpot de IFN γ de linfocitos T de sangre periférica a una diversidad de epítomos de linfocitos T (SEC ID N°: 2, 46, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 44).

55 **Figura 3:** muestra que las frecuencias de linfocitos T específicos de péptidos de gluten detectadas por ELISpot de IFN γ en PBMC recogidas el Día 6 después de que los donantes con enfermedad celíaca HLA-DQ2⁺ comiencen la exposición a trigo, cebada o centeno revelan una clara jerarquía de las respuestas.

60 **Figura 4:** muestra que los linfocitos T en sangre después de exposición a trigo respondieron a una jerarquía altamente uniforme de péptidos de gluten.

Figura 5: muestra el mapeo fino del péptido ω -gliadina inmunodominante, PQQPQQPQQPFPQPPQPPWQP (SEC ID N°: 52).

65 **Figura 6:** muestra clara jerarquía de péptidos en las bibliotecas de péptidos exhaustivas.

Figura 7: muestra las secuencias de péptidos verificados como péptidos estimulantes de linfocitos T, su jerarquía, dominancia y reconocimiento por clones de linfocitos T inducidos contra los péptidos más activos después de exposición a gluten de trigo, cebada o centeno.

5 **Figura 8:** muestra que la jerarquía de péptidos estimulantes de linfocitos T difiere según si los donantes de enfermedad celíaca se someten a exposición a trigo, cebada o centeno.

Figura 9: muestra que ciertas mezclas de péptidos de gluten estimulantes de linfocitos T dominantes activan números sustancialmente mayores de linfocitos T en sangre recogida después de exposición *in vivo* con granos que contienen gluten.

10 **Figura 10:** muestra que la combinación de NPL001 (SEC ID N°: 228), NPL002 (SEC ID N°: 229) y NPL003 (SEC ID N°: 230) (NexVax2) activa linfocitos T específicos para NPL001 (SEC ID N°: 228), en el intestino (ganglios linfáticos mesentéricos, MLN) así como el bazo y ganglios linfáticos poplíteos de drenaje local (PLN) después de administración subcutánea a la pata posterior. La proliferación de linfocitos T específicos de NPL001 es muy similar a los tres sitios anatómicos a pesar de que los péptidos se suministran a la pata posterior. La proliferación de linfocitos T depende de la dosis.

15 **Figura 11:** muestra que la administración repetida de NexVax2 (SEC ID N°: 228, 229 y 230) conduce a la reducción de la proporción (A) y número (B) de linfocitos T CD4⁺ específicos de gliadina en el bazo.

Figura 12: muestra que la administración repetida de NexVax2 conduce a la inducción de linfocitos Treg.

20 **Figura 13:** muestra que la administración repetida de NexVax2 (SEC ID N°: 228, 229 y 230) da como resultado un aumento de la proporción de células productoras de IFN γ e IL-10 directamente *ex vivo*.

Figura 14: muestra que la capacidad proliferativa de linfocitos T específicos de gliadina para antígeno afín se reduce después de la administración repetida de NexVax2 (SEC ID N°: 228, 229 y 230) y se restaura en presencia de IL-2.

25 **Figura 15:** muestra que los linfocitos T de ratones tratados con NexVax2 (SEC ID N°: 228, 229 y 230) son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T específicos de gliadina sin tratamiento previo.

Figura 16: muestra la producción de citocinas *in vitro*.

30 **Figura 17:** programa para dosificación, comidas y recogida de sangre del protocolo de vacunación.

Descripción detallada de la invención

Técnicas y definiciones generales

40 A no ser que se defina específicamente de otro modo, se interpretará que todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química proteica y bioquímica).

45 A no ser que se indique de otro modo, la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen y se explican a lo largo de la bibliografía en fuentes tales como J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984); J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991); D. M. Glover y B. D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996); F. M. Ausubel *et al.* (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad); Ed Harlow and David Lañe (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988); y J. E. Coligan *et al.* (editores), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).

50 Como se usa en la memoria descriptiva objeto, las formas singulares “un” y “el” incluyen aspectos plurales a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un péptido” incluye un único péptido, así como dos o más péptidos y así sucesivamente. Además, una célula presentadora de antígenos se proporciona habitualmente como una población de dichas células.

55 La expresión “enfermedad celíaca” se refiere a una enfermedad inflamatoria crónica del intestino delgado. La enfermedad abarca un espectro de afecciones caracterizadas por diversos grados de sensibilidad al gluten, incluyendo una forma grave caracterizada por una mucosa del intestino delgado plana (atrofia vellosa hiperplásica) y otras formas caracterizadas por síntomas más leves incluyendo fatiga, diarrea crónica, mala absorción de nutrientes,

pérdida de peso, distensión abdominal, anemia así como un riesgo sustancialmente potenciado del desarrollo de osteoporosis y tumores malignos intestinales (linfoma y carcinoma).

5 La expresión “sensible al gluten” se refiere al estado en el que un sujeto expuesto al gluten, o fragmento peptídico del mismo, muestra uno cualquiera o más de los síntomas de la enfermedad celíaca o una respuesta de linfocitos T inapropiada. En un sujeto que no es sensible al gluten, hay poca o ninguna respuesta de linfocitos T provocada por ingestión del gluten. Por el contrario, en un sujeto sensible al gluten hay una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4⁺ inapropiada a péptidos derivados del gluten después de la ingesta de los mismos.

10 Las expresiones “tolerancia inmunitaria”, “tolerancia inmunológica”, “tolerancia” o “desensibilización” se definen en el presente documento como hacer a un sujeto sensible o hipersensible, menos sensible, y sensible o no reactivo al gluten reduciendo la reactividad inmunológica de un sujeto al gluten. Puede generarse tolerancia inmunitaria, por ejemplo, por exposición de superficies mucosas a fragmentos antigénicos inductores de tolerancia del gluten como se define en el presente documento. La administración mucosa de antígeno tanto de dosis alta como de dosis baja puede dar como resultado tolerancia inmunitaria, en la que la respuesta inmunitaria a administración sistémica posterior del antígeno se reduce. Pueden existir al menos dos mecanismos de tolerancia inmunitaria. La tolerancia a altas dosis de un antígeno parece producirse por inactivación o delección clonal de linfocitos Th1 y Th2. Por el contrario, la tolerancia a bajas dosis de antígeno conduce a supresión inmunitaria testigo mediada por estimulación de linfocitos Treg para producir citocinas supresoras tales como interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) y TGFβ.

20 La expresión “inducir tolerancia inmunitaria” como se usa en el presente documento se refiere a ocasionar, producir o provocar tolerancia inmunitaria al gluten en un sujeto sensible al gluten.

25 El término “hipersensible” se define en el presente documento como fisiológicamente susceptible de forma anómala al gluten.

El término “anergia” se refiere a un estado de insensibilidad o hiposensibilidad reversible de un linfocito T (o linfocito B) en un antígeno.

30 Como se usa en el presente documento, “Treg” se refiere a una subclase de linfocitos T cuyo papel principal es proporcionar inmunidad mediada por linfocitos T durante una reacción inmunitaria con un fin, y suprimir linfocitos T autorreactivos que han escapado a la selección negativa en el timo. Una “respuesta de Treg”, como se usa en el presente documento, se caracteriza por la diferenciación y proliferación de la población de linfocitos Treg CD4⁺ o CD8⁺ que expresan el factor de transcripción de la familia forkhead FOXP3 (caja de forkhead p3) y/o la proteína asociada al MHC de Clase II LAG-3 y/o expresan altos niveles de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25). Hay también una población menor de linfocitos Treg que expresan FOXP3 CD8⁺ restringidos al MHC de Clase I. La presencia de linfocitos Treg en la circulación periférica o el bazo puede determinarse mediante análisis de la expresión de CD4⁺/CD25⁺. Esto puede conseguirse convenientemente usando citometría de flujo. Además, pueden cuantificarse linfocitos Treg determinando los niveles de ARNm de FOXP3 en células mononucleares derivadas de sangre periférica o de bazo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de transcriptasa inversa cuantitativa. Además, la inducción de una respuesta de Treg *in vivo* puede evaluarse por la medición de citocinas asociadas con Treg a partir de linfocitos mononucleares derivados de sangre periférica o ganglios linfáticos. Los linfocitos Treg muestran típicamente mayores niveles de expresión de las citocinas antiinflamatorias tales como IL-10 y TGFβ y la presencia de estos mediadores puede determinarse por métodos conocidos en la técnica, tales como citometría de flujo, tinción inmunohistoquímica o ELISA.

La expresión “péptido estimulante de linfocitos T” o “péptido estimulante” se refiere a un péptido o epítipo capaz de activar un linfocito T.

50 La expresión “activar” o “que activa” o “activación” en relación con un linfocito T se refiere a la presentación por una molécula del MHC en una célula de un epítipo a un receptor de linfocitos T apropiado en un segundo linfocito (T), junto con la unión de una molécula coestimulante por el linfocito T, induciendo de este modo una “respuesta de linfocitos T”.

55 Como se usa en el presente documento, “péptido tóxico” se refiere a un péptido que estimula la activación de linfocitos T en un sujeto.

El término “expansión” como se usa en el presente documento se refiere a la proliferación y amplificación de una población de linfocitos T después de activación de linfocitos T.

60 El término “inmunodominante” se refiere a una subunidad de un péptido (epítipo) que se reconoce más fácilmente por el sistema inmunitario y por lo tanto influye más en la especificidad de una respuesta inmunitaria inducida, tal como una respuesta de linfocitos T. “Inmunodominante” puede usarse indistintamente con “dominante” en el presente documento.

65

Como se usa en el presente documento, la expresión “modular una respuesta de linfocitos T” se refiere a regular o ajustar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten, de modo que la respuesta de linfocitos T al gluten se reduzca o disminuya.

5 Como se usa en el presente documento, “modificar la secreción de citocinas” se refiere a cambiar o alterar en alguna medida la secreción de citocinas por un sujeto sensible al gluten, de modo que los efectos de la sensibilidad al gluten en el sujeto se reduzcan o disminuyan. La expresión abarca tanto secreción aumentada de una citocina particular o combinación de citocinas como la secreción reducida de una citocina particular o combinación de citocinas.

10 Como se usa en el presente documento, “epítipo” se refiere a la parte de un antígeno o un péptido que se reconoce por el sistema inmunitario, por ejemplo, un receptor de linfocitos T o el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o de clase II, un anticuerpo, un receptor de linfocitos B, cuya parte es suficiente para unión de alta afinidad. En general, un epítipo lineal para reconocimiento será de al menos aproximadamente 7 aminoácidos de longitud, y puede ser de 8 aminoácidos, 9 aminoácidos, 10 aminoácidos o más.

El término “poliepítipo” se refiere a la presencia de dos o más epítipos (péptidos) unidos en una única cadena polipeptídica.

20 Como se usa en el presente documento, “antígeno” e “inmunógeno” y variaciones de los mismos se usan en general indistintamente y se refieren a la estructura que contiene epítipos reconocida por el sistema inmunitario.

25 La expresión “gluten” o “proteína del gluten” abarca gliadinas alfa (α), beta (β), gamma (γ) y omega (ω), y gluteninas de bajo y alto peso molecular (LMW y HMW) en trigo, hordeínas B, C y D en cebada, secalinas β , γ y ω en centeno y opcionalmente aveninas en avena. Los “péptidos de gluten” son péptidos derivados de, o abarcados dentro de, una o más de las proteínas del gluten.

30 El término “gliadina” se refiere a la fracción soluble en alcohol acuoso del gluten, particularmente, pero no exclusivamente, gluten derivado de trigo, por ejemplo *Triticum aestivum*.

El término “glutenina” se refiere a la fracción insoluble en alcohol acuoso del gluten, particularmente pero no exclusivamente, el gluten derivado de trigo, por ejemplo *Triticum aestivum*.

35 Como se usa en el presente documento, “hordeína” u “hordeína de cebada” se refiere al gluten derivado de cebada, *Hordein vulgare*.

Como se usa en el presente documento, “secalina” o “secalina de centeno” se refiere al gluten derivado de centeno, *Secale cereale*.

40 Como se usa en el presente documento, “avedina” o “avedina de avena” se refiere al gluten derivado de avena, *Avena sativa*.

45 La “transglutaminasa” tisular es un factor crucial en enfermedad celíaca porque promueve las respuestas de linfocitos T específicas de gluten. La transglutaminasa tisular provoca desamidación selectiva del gluten, que a su vez provoca la generación de una serie de péptidos de gluten que se unen con moléculas HLA-DQ2 o -DQ8 con alta afinidad. La interacción de péptido de gluten HLA-DQ2 (DQ8) resultante desencadena la respuesta de linfocitos T CD4 proinflamatoria. Por lo tanto, el término “desamidación” se refiere a la conversión de glutamina a ácido glutámico, o a la conversión de asparagina a ácido aspártico. Como se usa en el presente documento, la desamidación se refiere particularmente a la conversión de glutamina a ácido glutámico en gluten, un proceso que

50 aumenta la propensión de los péptidos de gluten para activar linfocitos T.

55 Las expresiones “antígeno de leucocitos humanos” y “HLA” se definen en el presente documento como una identificación genética en glóbulos blancos y plaquetas humanos, compuesta de proteínas que desempeñan un papel crítico en la activación del sistema inmunitario del cuerpo para responder a organismos ajenos. En seres humanos y otros animales, el HLA también se denomina “complejo mayor de histocompatibilidad” (MHC).

60 Como se usa en el presente documento, el término “agente” se refiere a una colección de péptidos y/o polinucleótidos. Los péptidos y/o polinucleótidos pueden estar en la misma composición (tal como una vacuna), en diferentes composiciones o una combinación de las mismas (por ejemplo, el primer y segundo epítipo definidos en el presente documento en una composición, y el tercero en una composición separada). Si están en composiciones diferentes, preferentemente estarán en proximidad estrecha, tal como en un kit. En consecuencia, los métodos de la invención contemplan proporcionar (por ejemplo, administrar a un sujeto) los péptidos y/o polinucleótidos componentes individuales de un agente de la invención en una única composición (vacuna), o secuencialmente en diferentes composiciones o una combinación de los mismos.

65

El término “sujeto” incluye entre otros a un individuo, paciente, diana, hospedador o receptor independientemente de si el sujeto es un animal humano o no humano incluyendo especies de mamífero y también especies aviares. El término “sujeto”, por lo tanto, incluye un ser humano, un primate no humano (por ejemplo gorila, tití, Mono Verde Africano), ganado (por ejemplo, oveja, vaca, cerdo, caballo, burro, cabra), animal de ensayo de laboratorio (por ejemplo, rata, ratón, conejo, cobaya, hámster), animal de compañía (por ejemplo, perro, gato), animal salvaje en cautividad (por ejemplo, zorro, ciervo, animales de caza) y especies aviares incluyendo aves de corral (por ejemplo, pollos, patos, gansos, pavos). El sujeto preferido, sin embargo, es un ser humano, más preferentemente un ser humano que es HLA-DQ2*.

10 Péptidos

Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” pueden usarse en general indistintamente y abarcan fragmentos biológicamente activos, variantes incluyendo homólogos y sales. Sin embargo, el término “péptido” se usa típicamente para hacer referencia a moléculas relativamente cortas que comprenden menos de 50, más preferentemente menos de 25 aminoácidos.

La longitud global de cada péptido definido en el presente documento puede ser, por ejemplo, de 7 a 50 aminoácidos, tales como 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos. Se contempla que péptidos más cortos pueden demostrar ser útiles, particularmente los de 20 o menos aminoácidos de longitud, en productos terapéuticos para reducir la probabilidad de anafilaxis pero es probable que péptidos más largos con múltiples epítomos sean tan eficaces como múltiples péptidos cortos en diagnóstico basado en linfocitos T funcional *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, un “fragmento biológicamente activo” consiste en menos aminoácidos que los del péptido de referencia definido, por ejemplo, por la secuencia de SEC ID N°: 13, 14 o 16. Preferentemente, los fragmentos biológicamente activos son capaces de generar una respuesta de linfocitos sustancialmente igual o mayor en un sujeto sensible al gluten que el péptido del que deriva. En otra realización, los fragmentos biológicamente activos son capaces de generar al menos 50%, más preferentemente al menos 75% de la respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten del péptido del que deriva. En una realización, los fragmentos biológicamente activos son de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 y no menos de 7 aminoácidos de longitud. Se contemplan particularmente deleciones y/o adiciones en uno de los extremo de cualquiera de los péptidos.

Son ejemplos de fragmentos biológicamente activos del péptido proporcionado como SEC ID N°: 13 los que incluyen PELP (SEC ID N°: 234), que se ha descubierto que es esencial para el reconocimiento de linfocitos T.

Los fragmentos de 7 unidades adecuados en consecuencia de SEC ID N°: 13 incluyen, pero sin limitación: QPELPYP (SEC ID N°: 235); PELPYPQ (SEC ID N°: 236); PQPELPY (SEC ID N°:237) y FPQPELP (SEC ID N°: 238).

Los fragmentos de 8 unidades adecuados de SEC ID N°: 13 incluyen, pero sin limitación: PELPYPQP (SEC ID N°: 239); QPELPYPQ (SEC ID N°: 240); PQPELPYP (SEC ID N°:241); FPQPELPY (SEC ID N°:242) y PFPQPELP (SEC ID N°: 243).

Los fragmentos de 9 unidades adecuados de SEC ID N°: 13 incluyen, pero sin limitación: PELPYPQPQ (SEC ID N°: 244); QPELPYPQP (SEC ID N°: 245); PQPELPYPQ (SEC ID N°: 246); FPQPELPYP (SEC ID N°: 247); PFPQPELPY (SEC ID N°: 248) y QPFPQPELP (SEC ID N°: 249).

Los fragmentos de 10 unidades adecuados de SEC ID N°: 13 incluyen, pero sin limitación: QPELPYPQPQ (SEC ID N°: 250); PQPELPYPQP (SEC ID N°: 251); PQPELPYPQP (SEC ID N°: 252); FPQPELPYPQ (SEC ID N°: 253); PFPQPELPYP (SEQ ID NO: 254); QPFPQPELPY (SEC ID N°: 255) y LQFPQPELP (SEC ID N°: 256).

Los fragmentos de 11 unidades adecuados de SEC ID N°: 13 incluyen, pero sin limitación: PQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 257); FPQPELPYPQP (SEC ID N°: 258); PFPQPELPYPQ (SEC ID N°: 259); QPFPQPELPYP (SEC ID N°: 260) y LQFPQPELPY (SEC ID N°: 261).

Los fragmentos de 12 unidades adecuados de SEC ID N°: 13 incluyen pero sin limitación: FPQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 262); PFPQPELPYPQP (SEC ID N°: 263); QPFPQPELPYPQ (SEC ID N°: 264) y LQFPQPELPYP (SEC ID N°: 265).

Los fragmentos de 13 unidades adecuados de SEC ID N°: 13 incluyen pero sin limitación: PFPQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 266); QPFPQPELPYPQP (SEC ID N°: 267) y LQFPQPELPYPQ (SEC ID N°: 268).

Los fragmentos de 14 unidades adecuados de SEC ID N°: 13 incluyen pero sin limitación: QPFPQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 269) y LQFPQPELPYPQP (SEC ID N°: 270).

ES 2 549 481 T3

Son ejemplos de fragmentos biológicamente activos del péptido proporcionado como SEC ID N°: 14 los que incluyen QPEQPF (SEC ID N°: 317), que se ha descubierto que es esencial para el reconocimiento de linfocitos T.

5 Los fragmentos de 7 unidades adecuados de SEC ID N°: 14 incluyen, pero sin limitación: QPEQPF (SEC ID N°: 271) y PQPEQPF (SEC ID N°: 272).

Los fragmentos de 8 unidades adecuados de SEC ID N°: 14 incluyen, pero sin limitación: QPEQPF (SEC ID N°: 273); PQPEQPF (SEC ID N°: 274) y FPQPEQPF (SEC ID N°: 275).

10 Los fragmentos de 9 unidades adecuados de SEC ID N°: 14 incluyen, pero sin limitación: QPEQPF (SEC ID N°: 276); PQPEQPF (SEC ID N°: 277); FPQPEQPF (SEC ID N°: 278) y PFPQPEQPF (SEC ID N°: 279).

15 Los fragmentos de 10 unidades adecuados de SEC ID N°: 14 incluyen, pero sin limitación: QPEQPF (SEC ID N°: 280); PQPEQPF (SEC ID N°: 281); FPQPEQPF (SEC ID N°: 282); PFPQPEQPF (SEC ID N°: 283) y QFPQPEQPF (SEC ID N°: 284).

20 Los fragmentos de 11 unidades adecuados de SEC ID N°: 14 incluyen, pero sin limitación: PQPEQPF (SEC ID N°: 285); FPQPEQPF (SEC ID N°: 286); PFPQPEQPF (SEC ID N°: 287) y QFPQPEQPF (SEC ID N°: 288).

Los fragmentos de 12 unidades adecuados de SEC ID N°: 14 incluyen, pero sin limitación: FPQPEQPF (SEC ID N°: 289); PFPQPEQPF (SEC ID N°: 290) y QFPQPEQPF (SEC ID N°: 291).

25 Los fragmentos de 13 unidades adecuados de SEC ID N°: 14 incluyen, pero sin limitación: PFPQPEQPF (SEC ID N°: 292) y QFPQPEQPF (SEC ID N°: 293).

Son ejemplos de fragmentos biológicamente activos del péptido proporcionado como SEC ID N°: 16 los que incluyen PIPEQP (SEC ID N°: 294), que se espera que sea esencial para el reconocimiento de linfocitos T.

30 Los fragmentos de 8 unidades adecuados de SEC ID N°: 16 incluyen, pero sin limitación: PIPEQP (SEC ID N°: 295) y QPIPEQP (SEC ID N°: 296).

35 Los fragmentos de 9 unidades adecuados de SEC ID N°: 16 incluyen, pero sin limitación: PIPEQP (SEC ID N°: 297); QPIPEQP (SEC ID N°: 298) y EQPIPEQP (SEC ID N°: 299).

40 Los fragmentos de 10 unidades adecuados de SEC ID N°: 16 incluyen, pero sin limitación: PIPEQP (SEC ID N°: 300); QPIPEQP (SEC ID N°: 301); EQPIPEQP (SEC ID N°: 302) y PEQPIPEQP (SEC ID N°: 303).

Los fragmentos de 11 unidades adecuados de SEC ID N°: 16 incluyen, pero sin limitación: PIPEQP (SEC ID N°: 304); QPIPEQP (SEC ID N°: 305); EQPIPEQP (SEC ID N°: 306) y PEQPIPEQP (SEC ID N°: 307).

45 Los fragmentos de 12 unidades adecuados de SEC ID N°: 16 incluyen, pero sin limitación: PIPEQP (SEC ID N°: 308); QPIPEQP (SEC ID N°: 309); EQPIPEQP (SEC ID N°: 310) y PEQPIPEQP (SEC ID N°: 311).

50 Los fragmentos de 13 unidades adecuados de SEC ID N°: 16 incluyen, pero sin limitación: QPIPEQP (SEC ID N°: 312); EQPIPEQP (SEC ID N°: 313) y PEQPIPEQP (SEC ID N°: 314).

Los fragmentos de 14 unidades adecuados de SEC ID N°: 16 incluyen, pero sin limitación: EQPIPEQP (SEC ID N°: 315) y PEQPIPEQP (SEC ID N°: 316).

55 En una realización, el agente o vacuna comprenden más de un fragmento peptídico biológicamente activo del péptido de SEC ID N°: 13, 14 y/o 16. Por ejemplo, el péptido de SEC ID N°: 13 podría sustituir dos péptidos separados, uno reconocido por linfocitos T específico para DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y el otro reconocido por linfocitos T específicos para DQ2- α -II (SEC ID N°: 4).

60 Se ha determinado que dentro del fragmento PELP de SEC ID N°: 13 esencial para el reconocimiento de linfocitos T, la E debe estar presente o puede ser opcionalmente una D. Ninguna otra sustitución permite el reconocimiento de linfocitos T. En consecuencia, cualquier variante o fragmento de SEC ID N°: 13 debe comprender la región PELP o PDLP.

65 Las variantes biológicamente activas incluyen péptidos que varían en uno o más aminoácidos con respecto al péptido definido, que también se conocen en la técnica como homólogos. Por ejemplo, una variante puede

comprender una o más sustituciones de aminoácidos en uno cualquiera o más de los péptidos. Como se usa en el presente documento, "sustituido" o "sustitución" incluye sustitución, reemplazo, adición, inserción, omisión y/o delección (ya que dichas variantes también pueden ser fragmentos) de un resto o restos de aminoácidos. En particular, esto se refiere a péptidos que tienen sustitución conservativa sin perder o disminuir significativamente su uso en los métodos de la invención. Preferentemente, las variantes biológicamente activas son capaces de generar una respuesta de linfocitos T sustancialmente igual o mayor en un sujeto sensible al gluten que el péptido del que deriva. En otra realización, las variantes biológicamente activas son capaces de generar al menos 50%, más preferentemente al menos 75% de la respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten del péptido del que deriva.

Las variantes biológicamente activas de los péptidos pueden identificarse modificando la secuencia de cada péptido y ensayando después el péptido resultante con respecto a la capacidad para estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, producción de linfocitos T.

En una realización, se varían no más de 5, más preferentemente no más de 4, más preferentemente no más de 3, más preferentemente no más de 2 y aún más preferentemente solamente 1 aminoácido en un péptido definido (por sustitución, delección o adición), en comparación con una secuencia peptídica definida en el presente documento.

En una realización alternativa, el porcentaje de identidad entre una secuencia particular (variante) y una secuencia de referencia (péptido definido en el presente documento) es de al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o mayor tal como al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o mayor. El porcentaje de identidad puede determinarse usando paquetes de software disponibles fácilmente, tales como BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/) y GAP.

En una realización, el segundo péptido comprende la secuencia de aminoácidos PQQPFPQPEQPFPWQP (SEC ID N°: 320), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.

En otra realización, el tercer péptido comprende la secuencia de aminoácidos FPEQPIEQPQPYPQQ (SEC ID N°: 321), o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.

Los aminoácidos naturales incluyen alanina (A), arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), cisteína (C), glutamina (Q), ácido glutámico (E), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), lisina (K), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y), valina (V), hidroxiprolina (O y/o Hyp), isoditirosina (IDT) y diisoditirosina (di-IDT). La hidroxiprolina, isoditirosina y diisoditirosina se forman postraduccionalmente. Se contempla en particular el uso de aminoácidos naturales, en particular los 20 aminoácidos codificados genéticamente.

Las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas, en las que el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares con el aminoácido correspondiente en la secuencia de referencia. Como alternativa, las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos no conservativas siempre que se mantenga la actividad deseada.

Como ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservativas implican la sustitución de un aminoácido alifático o hidrófobo, por ejemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina, con otro; sustitución de un aminoácido que contiene hidroxilo, por ejemplo, serina y treonina, con otro; sustitución de un resto ácido, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico, con otro; reemplazo de un resto que contiene amida, por ejemplo, asparagina y glutamina, con otro; reemplazo de un resto aromático, por ejemplo fenilalanina y tirosina, con otro; reemplazo de un resto básico, por ejemplo, lisina, arginina e histidina, con otro; y reemplazo de un aminoácido pequeño, por ejemplo, alanina, serina, treonina, metionina y glicina con otro.

Dichas sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones no dan como resultado un cambio en la actividad funcional, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 1, y la variante resultante puede analizarse con respecto a actividad funcional.

Tabla 1.	Sustituciones de aminoácidos.	
Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustitución Preferida
Ala (A)	Val; Leu; He	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp

Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; He; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; He	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Leu, He, Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

5 Pueden producirse variantes peptídicas por mutagénesis u otros métodos químicos. La exploración de alanina es una técnica útil para identificar aminoácidos importantes. En esta técnica, se reemplaza un resto de aminoácido por Ala y se determina su efecto en la actividad del péptido. Por ejemplo, pueden sustituirse restos de cisteína para minimizar la dimerización mediante enlaces disulfuro. Cada uno de los restos de aminoácidos del péptido se analiza de esta manera para determinar las regiones importantes del péptido. Se entienden bien en la técnica medios para preparar dichos péptidos.

10 Además de aminoácidos de origen natural, también se contemplan y están dentro del alcance de la invención aminoácidos de origen no natural o aminoácidos modificados. De hecho, como se usa en el presente documento, "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural, aminoácidos de origen no natural y análogos de aminoácidos, y a los estereoisómeros D o L de cada uno.

15 Una lista no limitante de aminoácidos no convencionales y/o no naturales que puede usarse como sustituciones adecuadas para los aminoácidos de origen natural y sus abreviaturas convencionales se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2. Aminoácidos no convencionales.

ácido α -aminobutírico	Abu
α -amino- α -metilbutirato	Mgabu
α -metilaminoisobutirato	Maib
α -metil- γ -aminobutirato	Mgabu
α -metilciclohexilalanina	Mchexa
α -metilciclopentilalanina	Mcpen
α -metil- α -naftilalanina	Manap
α -metilpenicilamina	Mpen
α -naftilalanina	Anap
ácido γ -aminobutírico	Gabu
aminociclopropano-carboxilato	Cpro
ácido aminoisobutírico	Aib
aminonorbornil-carboxilato	Norb
ciclohexilalanina	Chexa
ciclopentilalanina	Cpen
D-alanina	Dal
D-arginina	Darg
D-ácido aspártico	Dasp
D-cisteína	Dcys
D-glutamina	Dgln
D-ácido glutámico	Dglu
D-histidina	Dhis
D-isoleucina	Dile
D-leucina	Dleu
D-lisina	Dlys
D-metionina	Dmet
D-ornitina	Dorn
D-fenilalanina	Dphe
D-prolina	Dpro
D-serina	Dser
D-treonina	Dthr
D-triptófano	Dtrp
D-tirosina	Dtyr
D-valina	Dval
D- α -metilalanina	Dmala

D- α -metilarginina	Dmarg
D- α -metilasparagina	Dmasn
D- α -metilaspartato	Dmasp
D- α -metilcisteína	Dmcys
D- α -metilglutamina	Dmgln
D- α -metilhistidina	Dmhis
D- α -metilisoleucina	Dmile
D- α -metilleucina	Dmleu
D- α -metillisina	Dmlys
D- α -metilmetionina	Dmmet
D- α -metilornitina	Dmorn
D- α -metilfenilalanina	Dmphe
D- α -metilprolina	Dmpro
D- α -metilserina	Dmser
D- α -metiltreonina	Dmthr
D- α -metilriptófano	Dmtrp
D- α -metiltirosina	Dmty
D- α -metilvalina	Dmval
D-N-metilalanina	Dnmala
D-N-metilarginina	Dnmarg
D-N-metilasparagina	Dnmasn
D-N-metilaspartato	Dnmasp
D-N-metilcisteína	Dnmcys
D-N-metilglutamina	Dnmgln
D-N-metilglutamato	Dnmglu
D-N-metilhistidina	Dnmhis
D-N-metilisoleucina	Dnmile
D-N-metilleucina	Dnmleu
D-N-metillisina	Dnmlys
D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn
D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
D-N-metilprolina	Dnmpro
D-N-metilserina	Dnmser
D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp
D-N-metiltirosina	Dnmtyr
D-N-metilvalina	Dnmval
L-t-butilglicina	Tbug
L-etilglicina	Etg
L-homofenilalanina	Hphe
L-metiletilglicina	Metg
L-norleucina	Nle
L-norvalina	Nva
L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg
L- α -metilasparagina	Masn
L- α -metilaspartato	Masp
L- α -metil-t-butiglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys
L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilglutamina	Mgln
L- α -metilhistidina	Mhis
L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilisoleucina	Mile
L- α -metilleucina	Mleu
L- α -metillisina	Mlys
L- α -metilmetionina	Mmet
L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilnorvalina	Mnva
L- α -metilornitina	Morn
L- α -metilfenilalanina	Mphe
L- α -metilprolina	Mpro

L- α -metilserina	Mser
L- α -metiltreonina	Mthr
L- α -metilriptófano	Mtrp
L- α -metiltirosina	Mtyr
L- α -metilvalina	Mval
L-N-metilalanina	Nmala
L-N-metilarginina	Nmarg
L-N-metilasparagina	Nmasn
L-N-ácido metilaspártico	Nmasp
L-N-metilcisteína	Nmcys
L-N-metilglutamina	Nmgln
L-N-ácido metilglutámico	Nmglu
L-N-metilhistidina	Nmhis
L-N-metilisoleucina	Nmile
L-N-metilleucina	mleu
L-N-metillisina	Nmlys
L-N-metilmetionina	Nmmet
L-N-metilorleucina	Nmnle
L-N-metilorvalina	Nmnva
L-N-metilornitina	Nmorn
L-N-metilfenilalanina	Nmphe
L-N-metilprolina	Nmpro
L-N-metilserina	Nmser
L-N-metiltreonina	Nmthr
L-N-metilriptófano	Nmtrp
L-N-metiltirosina	Nmtyr
L-N-metilvalina	Nmval
L-N-metiletilglicina	Nmetg
L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
L-N-metilhomofenilalanina	Nmhphe
L-O-metilserina	Omser
L-O-metilhomoserina	Omhser
N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
N-(3-aminopropil)glicina	Norn
N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
N-(1-hidroxietyl)glicina	Nthr
N-(3-indoliletil)glicina	Nhtrp
N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
N-(1-metilpropil)glicina	Nile
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu
N-(1-metiletil)glicina	Nval
N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
N-bencilglicina	Nphe
N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
N-(carboximetil)glicina	Nasp
N-ciclobutilglicina	Ncbut
N-cicloheptilglicina	Nchep
N-ciclohexilglicina	Nchex
N-ciclodecilglicina	Ncdec
N-cilcododecilglicina	Ncdod
N-ciclooctilglicina	Ncoct
N-ciclopropilglicina	Ncpro
N-cicloundecilglicina	Ncund
N-(hidroxietyl)glicina	Nser
N-(p-hidroxifenil)glicina	Nhtyr
N-(imidazoliletil)glicina	Nhis
N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilaminoisobutirato	Nmaib
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa
N-metilciclopentilalanina	Nmcpen

N-metilglicina	Nala
N-metil- α -naftilalanina	Nmanap
N-metilpenicilamina	Nmpen
N-(tiometil)glicina	Ncys
penicilamina	Pen
N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil)glicina	Nnbhe
N-(N-(2,2-difeniletiletil)carbamilmetil)glicina	Nnbhm
1-carboxi-1-(2,2-difeniletilamino)ciclopropano	Nmbc

Se incluyen dentro del alcance de la presente invención un agente que comprende un péptido que se modifica durante o después de la traducción o síntesis (por ejemplo, por farnesilación, prenilación, miristoilación, glucosilación, palmitoilación, acetilación, fosforilación (tal como fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina), amidación, derivatización por grupos de bloqueo/protección conocidos, escisión proteolítica, enlace con una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, y similares). Puede utilizarse cualquiera de los numerosos métodos de modificación química conocidos dentro de la técnica incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄, acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc.

Las expresiones "grupo protector" y "grupo de bloqueo" como se usa en el presente documento, se refieren a modificaciones del péptido que lo protegen de reacciones químicas indeseables, particularmente *in vivo*. Los ejemplos de dichos grupos protectores incluyen ésteres de ácidos carboxílicos y ácidos borónicos, éteres de alcoholes y acetales, y cetales de aldehídos y cetonas. Los ejemplos de grupos adecuados incluyen grupos protectores de acilo tales como, por ejemplo, furoilo, formilo, adipilo, cetailo, suberilo, dansilo, acetilo, tehiló, benzoilo, trifluoroacetilo, succinilo y metoxisuccinilo; grupos protectores de uretano aromático tales como, por ejemplo, benciloxycarbonilo (Cbz), grupos protectores de uretano alifático tales como, por ejemplo, t-butoxicarbonilo (Boc) o 9-fluorenilmetoxi-carbonilo (Fmoc); piroglutamato y amidación. Los expertos en la materia conocerán muchas otras modificaciones que proporcionan potencia aumentada, actividad prolongada, facilidad de purificación y/o semivida aumentada.

En una realización, pueden generarse uno o más restos de glutamato de uno o más de los péptidos por actividad tTG sobre un péptido. En una realización alternativa, esta reacción sucede *in vivo* después de la administración.

Los péptidos pueden comprender una o más modificaciones, que pueden ser modificaciones postraduccionales naturales o modificaciones artificiales. La modificación puede proporcionar un resto químico (típicamente por sustitución de un hidrógeno, por ejemplo, de un enlace C-H), tal como un grupo amino, acetilo, acilo, carboxi, hidroxilo o halógeno (por ejemplo, flúor), o un grupo de carbohidrato. Típicamente, la modificación está presente en el extremo N o C terminal. Además, uno o más de los péptidos pueden estar PEGilados, en los que el PEG (grupo de polietileno) proporciona un tiempo de vida potenciado en el torrente sanguíneo. Uno o más de los péptidos también pueden combinarse como una proteína de fusión o quimérica con otras proteínas, o con agentes de unión específicos que permiten la dirección a restos específicos en una célula diana.

Pueden obtenerse variantes peptídicas en las que el péptido se ha modificado químicamente en el nivel de las cadenas laterales de aminoácidos, de quiralidad de aminoácidos y/o de la cadena principal peptídica.

Pueden realizarse cambios particulares a los péptidos que tengan SEC ID N°: 13, 14 y/o 16 para mejorar la resistencia a degradación u optimizar las propiedades de solubilidad o mejorar de otro modo la biodisponibilidad en comparación con el péptido parental, proporcionando de este modo péptidos que tengan propiedades terapéuticas, de diagnóstico y/o farmacocinéticas similares o mejoradas. Una de dichas modificaciones preferida incluye el uso de un grupo acetilo o piroglutamato N terminal y/o una amida C terminal. Se han mostrado modificaciones tales en la Tabla 5 que aumentan significativamente la semivida y biodisponibilidad de los péptidos en comparación con los péptidos precursores que tienen un extremo N y C terminal libre. Aunque se ha sugerido la acetilación N terminal y amidación C terminal en la técnica en relación con péptidos terapéuticos, el uso de un piroglutamato N terminal en el contexto de inducción de tolerancia inmunitaria no se ha analizado previamente. Se anticipa que otros péptidos útiles para inducir tolerancia inmunitaria también podrían beneficiarse de un acetilo o piroglutamato N terminal y/o una amida C terminal y en consecuencia, en un aspecto adicional, se proporciona un método para mejorar la semivida y/o biodisponibilidad de un péptido que comprende modificar el extremo N terminal del péptido mediante la adición de un acetilo o piroglutamato N terminal y modificar el extremo C terminal del péptido mediante la adición de una amida C terminal. En una realización particular, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada como SEC ID N°: 228, 229 y/o 230.

En una realización, la variante peptídica de SEC ID N°: 13 tiene la secuencia: piroELQFPQPELPYPQPQ-amida (SEC ID N°: 228; NPL001); o Ac-QLQFPQPELPYPQPQ-amida (SEC ID N°: 231; NPL030). En otra realización, la variante peptídica de SEC ID N°: 14 tiene la secuencia: piroEQFPQPEQFPWQP-amida (SEC ID N°: 229; NPL002); o Ac-QQFPQPEQFPWQP-amida (SEC ID N°: 232; NPL031).

En otra realización, la variante peptídica de SEC ID N°: 16 tiene la secuencia: piroEPEQPIPEQPYPQQ-amida (SEC ID N°: 230; NPL003); o Ac-FPEQPIPEQPYPQQ-amida (SEC ID N°: 233; NPL032).

- 5 El término “piroE” indica piroglutamato N terminal y el término “Ac” indica acetilo N terminal.

En una realización particular, el agente o vacuna comprende NPL001, NPL002 y NPL003. Dicho agente o vacuna se describe en el presente documento como NexVax2.

- 10 En otra realización, la variante peptídica de SEC ID N°: 13 tiene la secuencia: LPYPQPELPYPQ (SEC ID N°: 60; W01-E7).

En otra realización, al menos una glutamina, en uno cualquiera de los péptidos se sustituye por un glutamato.

- 15 Ciertos péptidos descritos en el presente documento pueden existir en formas geométricas o estereoisoméricas particulares. La presente invención contempla todas estas formas, incluyendo isómeros *cis* (Z) y *trans* (E), enantiómeros *R* y *S*, diastereómeros, (D)-isómeros, (L)-isómeros, las mezclas racémicas de los mismos, y otras mezclas de los mismos, como quedan dentro del alcance de la invención. Pueden estar presentes átomos de carbono asimétrico adicionales en un sustituyente, tal como un grupo alquilo. Se pretende que todos estos isómeros, así como mezclas de los mismos, se incluyan en la presente invención.

- 20 En otro ejemplo, para evitar la escisión por peptidasas, uno cualquiera o más de los péptidos pueden incluir un enlace peptídico no escindible en lugar de un enlace peptídico particularmente sensible para proporcionar un péptido más estable. Dichos enlaces peptídicos no escindibles pueden incluir aminoácidos beta.

- 25 En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los péptidos pueden incluir un grupo funcional, por ejemplo, en lugar del enlace peptídico escindible, que facilita la inhibición de una proteasa de tipo serina, cisteína o aspartato, según sea apropiado. Por ejemplo, la invención incluye una peptidil dicetona o un peptidil ceto éster, una péptido haloalquilcetona, un péptido sulfonil fluoruro, un peptidil boronato, un péptido epóxido, un peptidil diazometano, un peptidil fosfonato, isocoumarinas, benzoxacin-4-onas, carbamatos, isocianatos, anhídridos isoatoicos o similares. Dichos grupos funcionales se han proporcionado en otras moléculas peptídicas, y se conocen rutas generales para su síntesis.

- 30 Una variante puede ser un mimético. Se entiende que el término “mimético” se refiere a una sustancia que tiene alguna similitud química con la molécula que imita y conserva una actividad particular de interés (por ejemplo, que induce tolerancia). El fundamento subyacente detrás del uso de miméticos peptídicos, es que la cadena principal peptídica de proteínas existe principalmente para orientar cadenas laterales de aminoácidos de tal manera que faciliten las interacciones moleculares, tales como las de linfocitos T y péptidos MHC, anticuerpo y antígeno, enzima y sustrato o proteínas de armazón. Un mimético peptídico se diseña para permitir interacciones moleculares similares a la molécula natural. Los miméticos incluyen olefinas, fosfonatos, análogos de aza-aminoácidos y similares. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente métodos para diseñar miméticos de péptidos y podrán utilizarlos para diseñar miméticos de los péptidos definidos en el presente documento.

- 35 Los péptidos pueden analizarse por análisis de hidrofilia, que puede usarse para identificar las regiones hidrófobas e hidrófilas del péptido, ayudando de este modo al diseño de péptidos para manipulación experimental, tal como en experimentos de unión, síntesis de anticuerpos, etc. También puede realizarse análisis estructural secundario para identificar regiones de un péptido que adopten motivos estructurales específicos. Puede conseguirse manipulación, traducción, predicción de estructura secundaria, perfiles de hidrofilia e hidrofobicidad, predicción de fase abierta de lectura y representación, y determinación de homologías de secuencia, usando programas de software informático disponibles en la técnica. También pueden usarse otros métodos de análisis estructural incluyendo, pero sin limitación, cristalografía de rayos X, espectrometría de masas y cromatografía de gases, modelación informática, dispersión rotatoria óptica (ORD) o dicroísmo circular (CD).

- 40 Los péptidos, fragmentos o variantes pueden estar en una forma de sal, preferentemente, una forma de sal farmacéuticamente aceptable. “Una forma de sal farmacéuticamente aceptable” incluye las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de un péptido, por ejemplo, de ácido orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Las sales no tóxicas convencionales incluyen, por ejemplo, las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhídrico, sulfúrico, sulfónico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidromaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isotiónico y similares.

- 45 Los péptidos pueden proporcionarse en el agente o vacuna como péptidos separados o unidos, por ejemplo, en una estructura poliepitópica. En una realización, los péptidos pueden presentarse en una única cadena polipeptídica (serie poliepitópica), es decir, en una disposición lineal o circular. En otra realización, los péptidos pueden presentarse en un sistema de presentación de antígenos múltiple, particularmente basándose en una cadena

principal de dendrímero tal como polilisina. Una cadena principal de polilisina proporciona una disposición no lineal, ramificado, de epítomos. Este sistema proporciona la ventaja sobre una serie poliepitópica de que los péptidos no interfieren entre sí o son lábiles a la escisión en epítomos crípticos y por lo tanto son capaces de inducir una respuesta de linfocitos T completa.

5

Conjugados

Uno o más de los péptidos pueden conjugarse con un compuesto usando métodos convencionales. Los ejemplos de compuestos con los que pueden conjugarse los péptidos incluyen pero sin limitación un radioisótopo, un marcador fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, un marcador enzimático, un radical libre, un marcador de avidina-biotina, un marcador de bacteriófagos, un compuesto que aumenta la semivida del péptido en un sujeto, un adyuvante, una molécula del MHC o fragmento de la misma.

10

El compuesto puede facilitar la detección y/o el aislamiento o aumentar la inmunogenicidad del péptido conjugado.

15

“Conjugado” como se usa en el presente documento significa acoplado mediante enlaces covalentes o no covalentes. Aunque se prefieren enlaces covalentes, el compuesto también puede unirse con el péptido mediante formación de complejos sin enlace covalente, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno o interacción electrostática, hidrófoba, etc.

20

Los isótopos radiactivos típicos incluyen ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se y ^{152}Eu .

Los marcadores fluorescentes típicos incluyen fluoresceín isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

25

Los compuestos quimioluminiscentes típicos incluyen luminol, isoluminol, ésteres de acridinio aromáticos, imidazoles, sales de acridinio y los ésteres de oxalato. Los compuestos bioluminiscentes típicos incluyen luciferina, luciferasa y aecurina.

30

Los marcadores enzimáticos típicos incluyen fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, maleato deshidrogenasa, glucosa oxidasa y peroxidasa.

En una realización, se incluye un enlazador no específico entre el compuesto y el péptido con el que se conjuga. Dicho enlazador no está implicado en la actividad peptídica. En su lugar el enlazador puede actuar como un espaciador entre el péptido y un resto funcional. Los usos para un enlazador incluyen inmovilización del péptido, tal como para ayudar a la purificación o detección. Como alternativa, un enlazador puede permitir la unión de un compuesto con el péptido que permite el suministro específico del péptido con una diana particular, tal como una célula o un tejido, espacial o temporalmente. Cuando se usan como una vacuna, uno o más de los péptidos pueden acoplarse con un enlazador que actúa como un espaciador entre el péptido y un vehículo inmunógeno, o permite el acoplamiento mejorado entre el péptido y el vehículo inmunógeno y evita la formación de epítomos crípticos.

35

40

En una realización, uno o más de los péptidos se acoplan covalentemente con un adyuvante (proteína vehículo inmunógena), tal como toxoide diftérico (DT), hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide del tétanos (TT) o la proteína nuclear del virus de la gripe (NP), para aumentar su inmunogenicidad, usando cualquiera de varias químicas de conjugación conocidas en la técnica. Puede estar presente un enlazador no específico entre el péptido y el vehículo inmunógeno y se une preferentemente con el péptido o se sintetiza conjuntamente para facilitar el acoplamiento con el vehículo inmunógeno y/o para actuar como un espaciador entre el péptido y el vehículo inmunógeno.

45

Cuando se usa como un agente de diagnóstico, se conjugan preferentemente uno o más de los péptidos con un vehículo inmunógeno que no se ha usado previamente para vacunación. Cuando se controla el éxito de la vacunación, esto evita que el agente de diagnóstico reaccione con anticuerpos que se han formado contra la fracción de vehículo de la vacuna.

50

En una realización, el compuesto es una molécula del MHC de clase II o fragmento de unión a péptidos de la misma. La molécula del MHC de clase II puede purificarse a partir de una muestra biológica. Como alternativa, la molécula del MHC de clase II puede producirse de forma recombinante. Puede obtenerse un fragmento de unión a péptidos de la molécula del MHC de clase II, por ejemplo, mediante escisión enzimática de la molécula intacta purificada o recombinante. Como alternativa, el fragmento de unión a péptidos puede producirse de forma recombinante. En una realización preferida, el compuesto es una molécula del MHC de clase II de dos dominios recombinante.

55

60

En su forma más básica, la molécula del MHC de clase II de dos dominios comprende el dominio $\alpha 1$ y $\beta 1$ de una molécula de MHC de clase II de mamíferos en la que el extremo amino terminal del dominio $\alpha 1$ está unido covalentemente con el extremo carboxilo terminal del dominio $\beta 1$ y en el que el polipéptido no incluye los dominios $\alpha 2$ o $\beta 2$. La molécula del MHC de clase II de dos dominios se asocia por interacción covalente o no covalente con un péptido definido en el presente documento. En ciertas realizaciones, el péptido se une covalentemente con el

65

extremo amino terminal del dominio $\beta 1$ de la molécula de clase II. La molécula del MHC de clase II de dos dominios también puede comprender un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente, o una toxina. Cuando el marcador detectable o toxina va a unirse covalentemente con la molécula del MHC de una manera dirigida (es decir, en lugar de unirse aleatoriamente) se unirá generalmente con un extremo carboxilo terminal de la molécula para minimizar la interferencia con el antígeno peptídico unido en el extremo amino terminal.

In vitro, la molécula del MHC de clase II de dos dominios puede usarse para detectar y cuantificar linfocitos T y regular la función de linfocitos T. Por lo tanto, dichas moléculas cargadas con un péptido seleccionado pueden usarse para detectar, controlar y cuantificar la población de linfocitos T que son específicos para ese péptido. El conjugado de péptido/molécula del MHC de clase II de dos dominios también puede usarse para inducir anergia de linfocitos T específicos de gluten, aliviando síntomas asociados con la enfermedad celíaca. Como alternativa, dichas moléculas pueden conjugarse con una toxina para destruir más directamente los linfocitos T causantes de la enfermedad. Las toxinas adecuadas incluyen toxinas proteicas (por ejemplo, ricina, toxina diftérica y toxina de *Pseudomonas*), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, doxorubicina, daunorrubicina, metotrexato, citotoxina y ARN antisentido), anticuerpos para una molécula de superficie de linfocitos T citotóxica, lipasas, y radioisótopos que emiten radiación "dura", por ejemplo, beta.

Diseño de molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$ recombinante

Las secuencias de aminoácidos de proteínas de cadena α y β del MHC de clase II de mamífero, así como ácidos nucleicos que codifican estas proteínas, se conocen bien en la técnica y están disponibles de numerosas fuentes incluyendo GenBank.

Típicamente, se considera que el dominio $\alpha 1$ comprende aproximadamente los restos 1-90 de la cadena α madura. La región enlazadora peptídica nativa entre los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la proteína del MHC de clase II abarca de aproximadamente el aminoácido 76 a aproximadamente el aminoácido 93 de la cadena α , dependiendo de la cadena α particular que se considere. Por lo tanto, un dominio $\alpha 1$ puede incluir aproximadamente los restos de aminoácidos 1-90 de la cadena α , pero un experto en la materia reconocerá que el punto de corte C terminal de este dominio no está necesariamente definido de forma precisa y, por ejemplo, podría aparecer en cualquier punto entre los restos de aminoácidos 70-100 de la cadena α . La composición del dominio $\alpha 1$ también puede variar fuera de estos parámetros dependiendo de la especie de mamífero y la cadena α particular en cuestión.

De forma similar, se considera típicamente que el dominio $\beta 1$ comprende aproximadamente los restos 1-90 de la cadena β madura. La región enlazadora entre los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de la proteína del MHC de clase II abarca de aproximadamente el aminoácido 85 a aproximadamente el aminoácido 100 de la cadena β , dependiendo de la cadena β particular que se considere. Por lo tanto, la proteína $\beta 1$ puede incluir aproximadamente los restos de aminoácidos 1-100, pero un experto en la materia reconocerá de nuevo que el punto de corte C terminal de este dominio no está necesariamente definido de forma precisa y, por ejemplo, podría aparecer en cualquier punto entre los restos de aminoácidos 75-105 de la cadena β .

Cuando se selecciona la secuencia de un dominio particular para inclusión en una molécula recombinante, es preferible que se incluya el dominio completo; para asegurar que se hace esto, la secuencia de dominio puede extenderse para incluir parte del enlazador, o incluso parte del dominio adyacente. El número preciso de aminoácidos en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ varía dependiendo de la especie de mamífero así como entre clases de genes dentro de una especie. En lugar de una definición estructural precisa basada en el número de aminoácidos, lo que es importante cuando se selecciona la secuencia de aminoácidos de un dominio particular es el mantenimiento de la función de dominio. Además, un experto en la materia apreciará que la función de dominio también puede mantenerse si se utiliza algo menos de la secuencia de aminoácidos completa del dominio seleccionado. Por ejemplo, pueden omitirse varios aminoácidos en los extremos amino o carboxilo terminales del dominio $\alpha 1$ sin afectar a la función de dominio. Típicamente, sin embargo, el número de aminoácidos omitidos de uno de los extremos terminales de la secuencia de dominio no será mayor de 10, y más típicamente no será mayor de 5. De forma similar, los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ pueden incluir una o más variaciones de secuencia de aminoácidos en comparación con la forma de origen natural siempre que se mantenga la función de dominio.

La actividad funcional de un dominio seleccionado particular puede evaluarse en el contexto de la molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$ cargada con el péptido. Por ejemplo, para ensayar un dominio $\beta 1$ particular, se unirá con un dominio $\alpha 1$ funcional, el péptido de molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$ resultante se cargará y se ensayará con respecto a su capacidad para unirse con y/o inhibir la función de linfocitos T específicos de antígenos, por ejemplo, proliferación de linfocitos T.

Pueden producirse moléculas de ácido nucleico que codifiquen estos dominios mediante medios convencionales, tales como amplificación por la PCR. Pueden emplearse enfoques convencionales para diseñar cebadores para amplificar fases abiertas de lectura que codifican estos dominios. Las bibliotecas adecuadas para la amplificación de estos dominios incluyen, por ejemplo, bibliotecas de ADNc preparadas a partir de la especie de mamífero en

cuestión; dichas bibliotecas están disponibles en el mercado, o pueden prepararse por métodos convencionales. Por lo tanto, por ejemplo, pueden producirse construcciones que codifican los polipéptidos $\beta 1$ y $\alpha 1$ por PCR usando cuatro cebadores: cebadores B1 y B2 correspondientes a los extremos 5' y 3' de la región codificante $\beta 1$, y cebadores A1 y A2 correspondientes a los extremos 5' y 3' de la región codificante $\alpha 1$. Después de amplificación por PCR de las regiones codificantes de dominio $\alpha 1$ y $\beta 1$, estas moléculas de ácido nucleico amplificadas pueden clonarse cada una en vectores de clonación convencionales, o las moléculas pueden ligarse entre sí y después clonarse en un vector adecuado. Para facilitar la clonación conveniente de las dos regiones codificantes, pueden diseñarse sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los cebadores de PCR. Por ejemplo, los cebadores B2 y A1 pueden incluir cada uno un sitio adecuado de modo que los fragmentos amplificados puedan ligarse fácilmente entre sí después de amplificación e ingestión con la enzima de restricción seleccionada. Además, los cebadores B1 y A2 pueden cada uno incluir sitios de restricción para facilitar la clonación en el sitio de polienlazador del vector seleccionado. Se realiza ligamiento de las dos regiones codificantes de dominios de modo que las regiones codificantes se unan operativamente, es decir, para mantener la fase abierta de lectura. Cuando las regiones codificantes amplificadas se clonan por separado, los fragmentos pueden liberarse posteriormente del vector de clonación y purificarse en gel, como preparación para el ligamiento.

En ciertas realizaciones, se proporciona un enlazador peptídico entre los dominios $\beta 1$ y $\alpha 1$. Típicamente, este enlazador es de entre 2 y 25 aminoácidos de longitud, y actúa para proporcionar flexibilidad entre los dominios de modo que cada dominio es libre para plegarse en su conformación nativa. La secuencia enlazadora puede proporcionarse convenientemente diseñando los cebadores de PCR para que codifiquen la secuencia enlazadora. Por lo tanto, en el ejemplo descrito anteriormente, la secuencia enlazadora puede codificarse por uno de los cebadores B2 o A1, o una combinación de cada uno de estos cebadores.

Pueden producirse polipéptidos de dominio del MHC variantes manipulando la secuencia de nucleótidos de la molécula que codifica el dominio, por ejemplo, por mutagénesis dirigida o la PCR.

Enlace genético de péptido antigénico con molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$

La molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$ se usa junto con un péptido definido en el presente documento. La molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$ puede "cargarse" con el péptido de varias maneras, incluyendo por unión covalente del péptido con la molécula del MHC. Esto puede conseguirse convenientemente uniendo operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifique el péptido seleccionado con el extremo 5' de la construcción que codifica la molécula del MHC de modo que el péptido expresado se una con el extremo N terminal de $\beta 1$ de la molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$. Un modo conveniente de obtener este resultado es incorporar una secuencia que codifique el péptido en los cebadores de PCR usados para amplificar las regiones codificantes de MHC. Típicamente, se incluirá una secuencia que codifique una secuencia peptídica enlazadora entre las moléculas que codifiquen el péptido antigénico y el polipéptido del MHC. Para unir antígenos del MHC, el enlazador debería ser suficientemente largo para permitir que el péptido antigénico entre en el surco peptídico del polipéptido del MHC.

Este sistema genético para enlace del péptido antigénico con la molécula del MHC es particularmente útil cuando se van a producir varias moléculas del MHC con diferentes péptidos antigénicos. El sistema descrito permite la construcción de un vector de expresión en el que se incluye un sitio de escisión único en el extremo 5' de la región codificante del MHC (es decir, en el extremo 5' de $\beta 1$ de la molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$). Junto con dicha construcción, se realiza una biblioteca de secuencias codificantes de péptidos antigénicos, con cada región codificante de antígenos flanqueada por sitios para la enzima de restricción seleccionada. La inclusión de un antígeno particular en la molécula del MHC se realiza después simplemente (a) liberando la región codificante de antígeno con la enzima de restricción seleccionada, (b) escindiendo la construcción del MHC con la misma enzima de restricción y (c) ligando la región codificante de antígenos en la construcción del MHC. De esta manera, se pueden preparar un gran número de construcciones de polipéptidos del MHC y expresarse en un corto periodo de tiempo.

Carga de antígenos de moléculas $\beta 1\alpha 1$ y $\alpha 1\alpha 2$ vacías

Cuando la molécula del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$ se expresa y purifica en una forma vacía (es decir, sin péptido antigénico unido), el péptido antigénico puede cargarse en las moléculas usando métodos convencionales. Dichos métodos incluyen coincubación sencilla de la molécula del MHC purificada con una preparación purificada del péptido.

Como ejemplo, pueden cargarse moléculas del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$ vacías (1 mg/ml; 40 μ M) mediante incubación con un exceso molar 10 veces del péptido (1 mg/ml; 400 μ M) a temperatura ambiente, durante 24 horas. A continuación, el péptido no unido en exceso puede retirarse por diálisis contra PBS a 4 °C durante 24 horas. Como se conoce en la técnica, la unión del péptido con moléculas del MHC de clase II $\beta 1\alpha 1$ puede cuantificarse por cromatografía de capa fina en gel de sílice (TLC) usando péptido radiomarcado. Basándose en dicha cuantificación, la carga puede alterarse (por ejemplo, cambiando el exceso molar de péptido o el tiempo de incubación) para obtener el resultado deseado.

Polinucleótidos

Las expresiones “ácido nucleico”, “molécula de ácido nucleico”, “secuencia de ácido nucleico” y “polinucleótido” pueden usarse en general indistintamente y abarcan fragmentos biológicamente activos, y variantes incluyendo homólogos.

La longitud global de cada polinucleótido constituyente de un agente puede ser, por ejemplo, de 21 a 150 nucleótidos, tal como 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 nucleótidos.

Un “fragmento biológicamente activo” de una molécula de ácido nucleico consiste en menos nucleótidos que los de la secuencia polinucleotídica codificante del péptido de referencia y tiene una longitud de al menos aproximadamente 21 nucleótidos, y puede tener una longitud de al menos aproximadamente 35 nucleótidos.

Las expresiones “variante biológicamente activa” y “fragmento biológicamente activo” tienen significados análogos a los atribuidos anteriormente con respecto a los péptidos definidos en el presente documento.

Una “variante biológicamente activa” puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 60% de identidad con la secuencia polinucleotídica codificante del péptido de referencia. El porcentaje de identidad puede determinarse usando paquetes de software fácilmente disponibles, tales como BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/) y GAP.

Como alternativa, o además, la “variante biológicamente activa” puede hibridar con la secuencia de nucleótidos codificante del péptido de referencia (o una forma complementaria de la misma) en condiciones de baja rigurosidad. La referencia en el presente documento a “baja rigurosidad” se refiere a formamida de al menos aproximadamente 0 a al menos aproximadamente 15% v/v y sal de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para condiciones de lavado. En general, la baja rigurosidad es de aproximadamente 25-30 °C a aproximadamente 42 °C. La temperatura puede alterarse y pueden usarse temperaturas mayores para reemplazar formamida y/o para proporcionar condiciones de rigurosidad alternativas. Las condiciones de rigurosidad alternativas pueden aplicarse cuando sea necesario, tales como rigurosidad media o alta. La referencia en el presente documento a “rigurosidad media” se refiere a formamida de al menos aproximadamente 16% v/v a al menos 30% v/v y sal de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M para condiciones de lavado. La referencia en el presente documento a “alta rigurosidad” se refiere a formamida de al menos aproximadamente 31% v/v a al menos aproximadamente 50% v/v y sal de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M para condiciones de lavado.

En general, se lleva a cabo lavado a $T_m = 69,3 + 0,41 (G+C) \%$. Sin embargo, la T_m de una molécula de ácido nucleico bicatenaria se reduce en 1 °C con cada aumento del 1% en el número de pares de bases desapareadas. La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación.

Los niveles de rigurosidad particularmente preferidos se definen de la siguiente manera: la baja rigurosidad es tampón SSC 6x, SDS 0,1% p/v a 25-42 °C; la rigurosidad moderada es tampón SSC 2x, SDS 0,1% p/v a 20-65 °C; la alta rigurosidad es tampón SSC 0,1 X, SDS 0,1% p/v a al menos 65 °C.

Las variantes biológicas incluyen polinucleótidos que varían en uno o más nucleótidos del polinucleótido de referencia. Por ejemplo, una variante puede comprender una sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo (tal como el anillo de morfolina), nucleótido metilado, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.), enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos α -aoméricos, etc.).

Pueden proporcionarse en un vector polinucleótidos que codifican uno o más de los péptidos.

Un polinucleótido que codifica uno o más de los péptidos definidos en el presente documento puede usarse para la producción recombinante de los péptidos usando técnicas bien conocidas en este campo. Como alternativa, el polinucleótido puede usarse para inmunizar/hacer tolerante a un sujeto al gluten.

Un polinucleótido para su uso en la invención incluye una secuencia de ADN que puede derivarse de uno o más de los péptidos, teniendo en cuenta la degeneración del uso codónico. Esto se conoce bien en la técnica, así como el conocimiento del uso codónico en diferentes hospedadores de expresión, lo que es útil para optimizar la expresión recombinante de los péptidos.

Quando el polinucleótido se usa para la producción recombinante de uno o más de los péptidos, el polinucleótido puede incluir la secuencia codificante para los péptidos solamente o la secuencia codificante para los péptidos en fase de lectura con otras secuencias codificantes, tales como las que codifican una secuencia líder o secretora, una secuencia de pre, pro o prepro proteína, secuencia de péptido enlazador u otras partes de péptidos de fusión. Por ejemplo, puede codificarse una secuencia marcadora que facilita la purificación del péptido fusionado. En ciertas realizaciones, la secuencia marcadora es un péptido de hexahistidina, como se proporciona en el vector pQE (Qiagen, Inc.), o es un marcador HA, o es glutatión-S-transferasa. El polinucleótido también puede contener secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como secuencias transcritas, no traducidas, señales de corte y empalme y poliadenilación, sitios de unión a ribosomas y secuencias que estabilizan el ARNm.

Células presentadoras de antígenos

El agente y/o los péptidos definidos en el presente documento pueden suministrarse cargando APC con, por ejemplo, los primer, segundo y tercer péptidos, un fragmento biológicamente activo o variante de uno o más de los mismos y/o un polinucleótido que codifica uno o más de los mismos.

Preferentemente, las APC se seleccionan del grupo que consiste en células dendríticas, macrófagos, linfocitos B y células endoteliales sinusoides del hígado que expresan moléculas del MHC de clase II compartidas con el fenotipo del MHC del sujeto. Por ejemplo, las APC pueden expresar HLA-DQ2 (por ejemplo, HLA DQA1*05 y HLA DQB1*02) y/o HLA DQ8. Las APC empleadas para este fin pueden aislarse del sujeto al que van a suministrarse después de cargar, o pueden obtenerse de un sujeto alocoincidente.

Por "cargar" una APC se entiende que la APC se incuba o transfecta con los péptidos, un fragmento biológicamente activo o variante de uno o más de los mismos, o un polinucleótido que codifica uno o más de los mismos. La carga de una APC puede conseguirse mediante el uso de métodos de transfección de ácidos nucleicos convencionales, tales como transfección mediada por lípidos, electroporación y transfección de fosfato de calcio.

Producción peptídica

Los péptidos pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, los péptidos pueden producirse de forma recombinante y/o sintética.

Los péptidos pueden sintetizarse por técnicas de química convencionales, incluyendo síntesis por procedimiento automático usando un sintetizador peptídico disponible en el mercado. En general, se preparan análogos peptídicos por metodología de síntesis de péptidos de fase sólida que puede implicar acoplar cada resto de aminoácido protegido con un soporte de resina, preferentemente una resina de 4-metilbenzhidrilamina, mediante activación con dicitohexilcarbodiimida para producir un péptido con una amida C terminal. Como alternativa, puede usarse una resina de clorometilo (resina Merrifield) para producir un péptido con un ácido carboxílico libre en el extremo C terminal. Después de haberse unido el último resto, la resina peptídica protegida se trata con fluoruro de hidrógeno para escindir el péptido de la resina, así como desproteger los grupos funcionales de cadena lateral. El producto en bruto puede purificarse adicionalmente por filtración en gel, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de partición o cromatografía de intercambio iónico.

Si se desea, y como se ha destacado anteriormente, pueden introducirse diversos grupos en el péptido del agente durante la síntesis o durante la expresión, lo que permite la unión con otras moléculas o con una superficie. Por ejemplo, pueden usarse cisteínas para realizar tioéteres, histidinas para unirse con un complejo de iones metálicos, grupos carboxilo para formar amidas o ésteres, grupos amino para formar amidas, y similares.

Los péptidos también puede producirse usando sistemas de traducción sin células. Los sistemas de traducción convencionales, tales como lisados de reticulocitos y extractos de germen de trigo, usan ARN como molde; mientras que los sistemas "acoplados" y "unidos" comienzan con moldes de ADN, que se transcriben a ARN y después se traducen.

Como alternativa, los péptidos pueden producirse transfectando células hospedadoras con vectores de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican uno o más péptidos.

Para producción recombinante, se introduce una construcción recombinante que comprende una secuencia que codifica uno o más de los péptidos en células hospedadoras por métodos convencionales tales como transfección de fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección.

Uno o más de los péptidos pueden expresarse en células hospedadoras adecuadas, tales como, por ejemplo células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293 HEK, VERO, HeLa, HepG2, MDCK, W138 o NIH 3T3), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* o *Pichia*), bacteria (por ejemplo, *E. coli*, *P. pastoris* o *B. subtilis*), células de insectos (por ejemplo, baculovirus en células Sf9) u otras células bajo el control de promotores apropiados usando técnicas convencionales. Después de la transformación de la cepa hospedadora adecuada y el crecimiento de la

cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, las células se recogen por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto en bruto resultante se conserva para purificación adicional del péptido o variante del mismo.

5 Los vectores de expresión adecuados incluyen, por ejemplo, polinucleótidos cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos, por ejemplo, derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN viral tal como virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociado, lentivirus, virus de viruela del canario, virus de viruela aviar, seudorrabia, baculovirus, virus del herpes y retrovirus. El polinucleótido puede introducirse en el vector de expresión por procedimientos
10 convencionales conocidos en la técnica.

El polinucleótido que codifica uno o más péptidos puede unirse operativamente con una secuencia de control de la expresión, es decir, un promotor, que dirige la síntesis de ARNm. Los ejemplos representativos de dichos promotores incluyen el promotor de LTR o SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor de PL de fago lambda y otros
15 promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células eucariotas o procariotas o en virus. El vector de expresión también puede contener un sitio de unión a ribosomas para inicio de la traducción y un terminador de la transcripción.

Los vectores de expresión también pueden incluir un origen de replicación y un marcador seleccionable, tal como el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* para permitir la selección de células transformadas, es decir, células que expresan el polinucleótido heterólogo. La molécula de ácido nucleico que codifica uno o más de los péptidos puede incorporarse en el vector en fase con secuencias de inicio y terminación de la traducción.

Uno o más de los péptidos pueden recuperarse y purificarse de cultivos celulares recombinantes (es decir, de las células o el medio de cultivo) por métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de lectinas y HPLC. Puede emplearse técnicas bien conocidas para replegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el péptido se desnaturaliza durante el aislamiento y/o la purificación.
25

Para producir un péptido glucosilado, se prefiere usar técnicas recombinantes. Para producir un péptido glucosilado, se prefiere emplear células de mamífero tales como COS-7 y Hep-G2 en las técnicas recombinantes.
30

Los péptidos también pueden prepararse por escisión de péptidos más largos, especialmente de extractos de alimentos.
35

Pueden sintetizarse sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos a partir de los péptidos que contienen un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales. Generalmente, las sales se preparan haciendo reaccionar la base o el ácido libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido o base orgánico o inorgánico formador de sales deseado en un disolvente adecuado.
40

Vacunas y administración

La invención también proporciona una vacuna que comprende los primer, segundo y tercer péptidos, un fragmento biológicamente activo o variante de uno o más de los mismos y/o un polinucleótido que codifica uno o más de los mismos. También se proporciona una vacuna que comprende un péptido de la invención y/o un polinucleótido de la invención.
45

Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una composición que comprende o que codifica péptidos que pueden administrarse a un sujeto sensible al gluten para modular la respuesta del sujeto al gluten. La vacuna puede reducir la reactividad inmunológica de un sujeto al gluten. Preferentemente, la vacuna induce tolerancia al gluten.
50

La administración de la vacuna a un sujeto puede inducir tolerancia por supresión clonal de poblaciones de linfocitos T efectoros específicos del gluten, por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ específicos del gluten, o mediante inactivación (anergia) de dichos linfocitos T de modo que se hagan menos sensibles, preferentemente, no sensibles a exposición posterior al gluten (o péptidos de los mismos).
55

Como alternativa, o además, la administración de la vacuna puede modificar el perfil de secreción de citocinas del sujeto (por ejemplo, dar como resultado IL-4, IL-2, TNF α y/o IFN γ reducidos y/o IL-10 aumentado). La vacuna puede inducir subpoblaciones de linfocitos T supresores, por ejemplo linfocitos Treg, para producir IL-10 y/o TGF β y de este modo suprimir linfocitos T efectoros específicos del gluten.
60

La vacuna de la invención puede usarse para tratamiento profiláctico de un sujeto capaz de desarrollar sensibilidad al gluten, por ejemplo, que se ha diagnosticado que porta el gen de HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 y/o tratamiento continuo de un sujeto que es sensible al gluten, por ejemplo, un sujeto que tiene enfermedad celiaca. Hay datos animales
65

considerables para apoyar la actividad profiláctica de péptidos inmunodominantes para diversas afecciones autoinmunitarias e inmunitarias modelo, por ejemplo, encefalitis alérgica experimental.

5 Como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” incluye anular, inhibir, ralentizar o invertir la progresión de una enfermedad o afección, o aliviar o prevenir un síntoma clínico de la enfermedad (por ejemplo, enfermedad celíaca) o afección.

10 La cantidad de vacuna (o agente, péptido, polinucleótido y/o APC) para administrar se denomina la “cantidad eficaz”. La expresión “cantidad eficaz” significa la cantidad suficiente para proporcionar el efecto terapéutico o fisiológico deseado cuando se administra en condiciones apropiadas o suficientes. Pueden administrarse dosis individuales o múltiples. En ocasiones se manifiestan efectos indeseables, por ejemplo, efectos secundarios, junto con el efecto terapéutico deseado; por lo tanto, un practicante equilibra los beneficios potenciales contra los riesgos potenciales al determinar una “cantidad eficaz” apropiada. La cantidad exacta requerida variará entre sujetos, dependiendo de la especie, la edad, la talla y la condición general del sujeto, modo de administración y similares. Por lo tanto, puede 15 que no sea posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, una “cantidad eficaz” en cualquier caso individual puede determinarse por un experto habitual en la materia usando solamente experimentación rutinaria.

20 La vacuna (o agente, péptido, polinucleótido y/o APC) modifica la respuesta de linfocitos T al trigo, la cebada y el centeno en el sujeto, y preferentemente al trigo, la cebada, el centeno y la avena, como se representa por las proteínas gliadina, secalina, hordeína, glutenina y opcionalmente avenina. Por lo tanto, un sujeto que se trata de acuerdo con la invención preferentemente es capaz de comer al menos trigo, centeno, cebada y opcionalmente avena sin una respuesta de linfocitos T significativa que normalmente conduciría a síntomas de enfermedad celíaca.

25 Los componentes individuales de un agente de la invención pueden administrarse en la misma composición o en composiciones diferentes o una combinación de las mismas (por ejemplo, el primer y segundo péptido definido en el presente documento en una composición, y el tercer péptido en una composición separada). Si están en composiciones diferentes, se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente.

30 El agente o la vacuna pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica, tóxica o de otro modo adversa cuando se administra a un sujeto, particularmente un mamífero, y más particularmente un ser humano. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser sólido o líquido. Los ejemplos útiles de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, diluyentes, excipientes, disolventes, tensioactivos, agentes de suspensión, agentes tamponantes, agentes lubricantes, adyuvantes, vehículos, 35 emulsionantes, absorbentes, medios de dispersión, recubrimientos, estabilizantes, coloides protectores, adhesivos, espesantes, agentes tixotrópicos, agentes de penetración, agentes secuestrantes, agentes de retardo de la absorción e isotónicos que no afectan a la actividad de los agentes activos de la invención.

40 El vehículo puede ser cualquiera de los usados convencionalmente y está limitado solamente por consideraciones quimicofísicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el agente activo, y por la vía de administración. Los vehículos adecuados para la presente invención incluyen los usados convencionalmente, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución tamponada, hialuronano, glicoles, almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, glicerol monoestearato, cloruro sódico, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y 45 similares. También pueden usarse liposomas como vehículos.

Se conocen en general en este campo técnicas para preparar composiciones farmacéuticas como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed. Mack Publishing Company, 1980.

50 El término “adyuvante” se refiere en general a una sustancia inmunoestimulante diseñada para potenciar la inmunogenicidad de uno o más péptidos definidos en el presente documento. Preferentemente, el adyuvante no produce una respuesta de Th1 y además promueve la tolerancia inmunitaria y/o reduce la inflamación. Los adyuvantes adecuados incluyen 1) un adyuvante de sal mineral basado en aluminio, por ejemplo un gel de $Al(OH)_3$ o fosfato de aluminio, pero también pueden ser una sal de calcio, hierro o cinc; y 2) dexametasona (Kang *et al.*, 2008). 55

La administración puede ser por vía oral, tópica (percutánea), parenteral, por pulverización de inhalación o por vía rectal en formulaciones unitarias de dosificación que contienen vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. El término “parenteral”, como se usa en el presente documento incluye inyección intravenosa, 60 intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intracavitaria, transdérmica y subcutánea, aerosol para administración a los pulmones o la cavidad nasal, o administración por infusión, por ejemplo, mediante bomba osmótica.

65 Los compuestos activos de la invención pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos dispersables o gránulos, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Pueden prepararse composiciones destinadas a uso oral de acuerdo con métodos conocidos en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones

pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saporíferos, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y apetitosas.

5 *Comprimidos*

También pueden fabricarse por métodos conocidos comprimidos que contienen el principio activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes usados pueden ser por ejemplo, (1) diluyentes inertes tales como carbonato cálcico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; (2) agentes de granulación o disgregantes tales como almidón de maíz, o ácido alginico; (3) agentes de unión tales como almidón, gelatina o goma arábiga y (4) agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden estar recubiertos por técnicas conocidas para retardar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y de este modo proteger una acción sostenida a lo largo de un periodo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como gliceril monoestearato o gliceril diestearato. También pueden recubrirse para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para liberación controlada.

En algunos casos, las formulaciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín. También pueden estar en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Suspensiones acuosas

Las suspensiones acuosas contienen normalmente los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes pueden incluir: (1) agentes de suspensión tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; o (2) agentes de dispersión o humectantes tales como ésteres de PEG de ácidos grados C₂-C₁₈, Tween 80 o polietileno óxido sorbitán monooleato, Brij o alcohol de polioxietileno, Triton-X o Polietilenglicol p-isooctilfenil éter, Triton-N y Triton A-20 o 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenol, polímero con formaldehído y oxirano, DECON, Tris o 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol y Cremophor EL.

Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, etil o n-propil p-hidroxibenzoato; uno o más agentes colorantes; uno o más agentes saporíferos; y uno o más agentes edulcorantes tales como sacarosa, aspartamo o sacarina.

Suspensiones oleosas

Pueden formularse suspensiones oleosas suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, un aceite de pescado que contenga ácido graso omega 3, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes y agentes saporíferos para proporcionar una preparación oral apetitosa. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

45 *Polvos y gránulos dispersables*

Son adecuados polvos y gránulos dispersables para la preparación de una suspensión acuosa. Proporcionan el principio activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión se ejemplifican por los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, los agentes edulcorantes, saporíferos y colorantes descritos anteriormente.

Emulsión

La composición o las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral tal como parafina líquida o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen goma arábiga, goma de tragacanto, soja, lecitina, polioxietileno óxido sorbitán monooleato (Tween 80). Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y saporíferos.

60 *Jarabes y elixires*

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, aspartamo o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un demulcente, conservante, saporífero y agentes colorantes.

Inyectables

La composición o las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con métodos conocidos usando los agentes de expresión o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1.3-butanodiol. Entre los vehículos aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites estériles, fijos, como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral incluyen, pero sin limitación, soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas. Los ejemplos de mecanismos de suministro apropiados para administración subcutánea incluyen, pero sin limitación, implantes, depósitos, agujas, cápsulas y bombas osmóticas.

Composiciones de liberación sostenida

Pueden prepararse composiciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas, copolímeros de L-ácido glutámico y γ etil-L-glutamato, etilvinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitúterico. Aunque polímeros tales como etilvinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

El agente activo puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidrometilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

La microencapsulación para liberación sostenida se ha realizado con éxito con hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón (rhIFN), interleucina 2 y MN rgp120. Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de PLGA debido a su biocompatibilidad y amplia serie de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, pueden eliminarse rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la capacidad de degradación de este polímero puede ajustarse de meses a años dependiendo de su peso molecular y composición.

Terapia génica

En una realización adicional, se inserta un polinucleótido que codifica uno o más péptidos definidos en el presente documento en un vector de expresión recombinante para los fines de administración al sujeto.

La expresión "vector de expresión recombinante" se refiere a un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que se ha manipulado por inserción o incorporación de ácido nucleico que codifica uno o más péptidos. Dichos vectores de expresión contienen una secuencia promotora que facilita la transcripción eficaz en el hospedador de la secuencia genética insertada. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor, así como genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas.

En una realización, el vector viral deriva de virus adenoasociado (AAV) y comprende un promotor constitutivo o regulable capaz de conducir niveles suficientes de expresión de los péptidos definidos en el presente documento. Preferentemente, el vector viral comprende secuencias de repeticiones terminales invertidas de AAV, tales como las descritas en el documento WO 93/24641. En una realización preferida, el vector viral comprende secuencias polinucleotídicas del plásmido pTR-UF5. El plásmido pTR-UF5 es una versión modificada de la serie pTR.sub.BS-UF/UF1/UF2/UF3 de plásmidos (Zolotukiin *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1998).

Los promotores útiles con la invención objeto incluyen, por ejemplo, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), el promotor 1- α del factor de elongación humano (EF1), los promotores de ARN nuclear pequeño (U1a y U1b), el promotor de cadena pesada de α -miosina, promotor de virus de Simio 40 (SV40), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor tardío mayor de adenovirus, promotor de β -actina y elemento regulador híbrido que comprende un potenciador de CMV/promotor de β -actina. Se ha mostrado que estos promotores están activos en una amplia serie de células de mamífero.

Los promotores se unen operativamente con polinucleótido heterólogo que codifica uno o más péptidos definidos en el presente documento. Por "se une operativamente", se entiende que el elemento promotor se sitúa en relación con la secuencia codificante para ser capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante.

- 5 También se contempla para uso con los vectores de la presente invención promotores específicos de tipo celular e inducibles, por ejemplo, promotores inducibles por Tet (Clontech, Palo Alto, Calif.) y promotores de VP16-LexA (Nettelbeck *et al.*, 1998).

- 10 También pueden incluirse en el vector elementos potenciadores de la transcripción que pueden actuar para aumentar los niveles de transcripción a partir de un promotor dado. Los potenciadores pueden colocarse en general en cualquiera de las orientaciones, 3' o 5', con respecto a secuencias promotoras. Además de los potenciadores naturales, pueden usarse en la presente invención potenciadores sintéticos, por ejemplo, puede usarse en el vector un potenciador sintético ensamblado de forma aleatoria a partir de elementos derivados de Spc5-12 incluyendo elementos específicos de músculo, elemento de unión a factor de respuesta a suero (SRE), factor potenciador específico de miocitos 1 (MEF-1), factor potenciador específico de miocitos 2 (MEF-2), factor potenciador de la transcripción 1 (TEF-1) y SP-1 (Li *et al.*, 1999; Deshpande *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1996; Mitchell y Tjian, 1989; Briggs *et al.*, 1986; Pitluk *et al.*, 1991).

- 20 Los métodos de terapia génica pueden realizarse por tratamiento *ex vivo* o *in vivo* de las células o los tejidos del paciente. Pueden introducirse vectores en células, líneas celulares o tejidos adecuados usando métodos conocidos en la técnica. Las partículas virales y los vectores pueden introducirse en células o tejidos *in vitro* o *in vivo*. Los métodos contemplados incluyen transfección, transducción, inyección e inhalación, por ejemplo, pueden introducirse vectores en células usando liposomas que contienen los vectores objeto, por transfección directa con vectores solamente, electroporación o por bombardeo de partículas.

25 *Dosificación*

- 30 Es especialmente ventajoso formular el activo en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y tener uniformidad de dosificación. La "forma de dosificación unitaria" como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto para tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de agente activo que se ha calculado que produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias se dicta por y depende directamente de las características únicas del agente activo y el efecto terapéutico particular que se pretende conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos tales como un agente activo para el tratamiento de sujetos. Como alternativa, las composiciones pueden presentarse en forma de multidosis.

- 40 Los ejemplos de unidades de dosificación incluyen ampollas selladas y viales y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

- El agente o vacuna también puede incluirse en un recipiente, envase o dosificador junto con instrucciones para su administración.

- 45 La cantidad real administrada (o dosis o dosificación) y la velocidad y ciclo temporal de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de la afección que se trate. La receta del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, momento, frecuencia, etc., está dentro de la responsabilidad de los practicantes generales o especialistas (incluyendo practicante médico humano, veterinario o científico médico) y típicamente tiene en cuenta el trastorno para tratar, la condición del sujeto, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los practicantes. Pueden encontrarse ejemplos de técnicas y protocolos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990), Mack Publishing, Company, Easton, PA, EE.UU.). La dosis, frecuencia de 50 dosis, duración, vía de administración y necesidad de terapia de mantenimiento podrían basarse en los criterios de otros productos inmunoterapéuticos peptídicos.

- 55 Las cantidades eficaces pueden medirse de ng/kg de peso corporal a g/kg de peso corporal por minuto, hora, día, semana o mes.

- 60 Cuando se emplea administración *in vivo* de un agente o vacuna de la invención, las cantidades de dosificación normal pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más al día, preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporcionan directrices con respecto a dosificaciones y métodos de suministro particulares.

- 65 La toxicidad y eficacia terapéutica del agente o la vacuna pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales determinando la CI_{50} y la dosis tolerada máxima. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo adecuado para seres humanos.

Diagnóstico y eficacia de tratamiento

Los péptidos definidos en el presente documento también son útiles como un agente de diagnóstico.

5 En un ejemplo, al tolerancia al gluten se evalúa midiendo IL-10 y/o TGF β secretados de células estimuladas, por ejemplo, linfocitos Treg, expuestas a los péptidos definidos en el presente documento. Los linfocitos Treg se caracterizan por su capacidad para producir grandes cantidades de IL-10 y TGF β . Se considera que IL-10 es una de las principales citocinas implicadas en la inmunosupresión; una diana para la supresión parece ser el control transcripcional de IL-2 en células efectoras.

10 En otro ejemplo, la tolerancia al gluten se evalúa midiendo IFN γ secretado de células estimuladas, por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ específicos de gluten.

15 El ensayo de diagnóstico puede realizarse *in vitro* usando sangre completa o células aisladas y/o fraccionadas a partir de la misma.

20 En un ejemplo, las células se han expuesto previamente a uno o más de los péptidos (bien solos, conjugados con una molécula del MHC o un fragmento de los mismos, o bien APC cargadas con péptidos). En otro ejemplo, las células se estimulan *in vitro* mediante coincubación con los péptidos (bien solos, conjugados con una molécula de MHC o fragmento de la misma, o bien APC cargadas con péptidos).

25 Los efectos mediados por linfocitos T directos del agente pueden controlarse por ensayos funcionales utilizando células aisladas de sangre periférica o tejido (por ejemplo, el intestino delgado). Los efectos de la administración de péptidos corriente abajo para linfocitos T afines podrían evaluarse usando tipos celulares inmunitarios, tejidos, fluidos biológicos (por ejemplo, plasma, secreciones intestinales, orina o heces).

30 En general los efectos biológicos de los péptidos reconocidos por linfocitos T afines son bien proinflamatorios o bien tolerogénicos, dependiendo del régimen de dosis, el modo de administración y si los péptidos se modifican o coadministran con otro compuesto que tiene propiedades inmunológicas, por ejemplo, un adyuvante. Estos y otros péptidos seleccionados para uso en vacunas terapéuticas basadas en péptidos son generalmente cortos (< 29 aminoácidos), solubles en agua, sin efectos inmunitarios innatos y se reconocen por una proporción sustancial de linfocitos T patógenos. Basándose en observaciones en modelos animales de enfermedad medida por linfocitos T y en otras enfermedades humanas, la administración inicial se seguiría de activación de linfocitos T afines. Sin embargo, se espera que la administración repetida del agente induzca anergia de linfocitos T y/o tolerancia. Se espera que la administración de péptidos regular continua mantenga la tolerancia al gluten, suprima la inflamación en el intestino delgado e inhiba los linfocitos T específicos de gluten proinflamatorios en todo el cuerpo.

40 Por lo tanto, el marcador clave del éxito terapéutico sería la ausencia de inflamación en el intestino delgado después de ingesta de gluten deliberada. Los marcadores sustitutos de inmunidad que probablemente predigan tejido intestinal normal o inflamado después de la ingesta de gluten incluyen una amplia serie de ensayos que utilizan mezclas puras o en bruto de células inmunitarias, fluidos biológicos, o muestras tisulares, para medir las proteínas solubles o asociadas a células o moléculas pequeñas asociadas con activación inmunitaria, inflamación o tolerancia. Estos ensayos se conocen bien por los inmunólogos, inmunohistólogos y especialistas clínicos familiarizados con enfermedades inmunitarias en roedores, seres humanos y, en particular, enfermedad celíaca. Los marcadores, más específicamente, que evalúan la actividad de la enfermedad celíaca e inmunidad inducida por gluten incluyen histología del intestino delgado, gliadina específica de IgA e IgG del suero (proteína o péptido) y para diversas proteínas hospedadoras incluyendo tTG.

50 Los marcadores genéricos y específicos de inmunidad en enfermedad celíaca que podrían adaptarse para su uso en el control de la inmunoterapia peptídica para enfermedad celíaca o para diagnóstico de enfermedad celíaca incluyen los siguientes:

55 (a) Los efectos directos de los péptidos en el linfocito T CD4⁺ aislado de sangre o tejido pueden controlarse *ex vivo/in vitro* por liberación de citocinas estimuladas por péptidos, proliferación de linfocitos T o determinación de marcadores de linfocitos T CD4⁺ que pueden alterarse *in vivo*.

60 (b) La frecuencia y el fenotipo de linfocitos T CD4⁺ individuales específicos para los péptidos o el gluten en general pueden evaluarse por enumeración directa de células, por ejemplo, por análisis de FACS. Se sabe que la ingesta oral del gluten en pacientes con enfermedad celíaca normalmente después de una dieta sin gluten estimula a los linfocitos T específicos de los péptidos y el gluten en general. Un ensayo clínico tal como una exposición al gluten puede usarse para evaluar los linfocitos T inducidos en sangre u otros tejidos. El fenotipo de linfocitos T aislados puede después evaluarse de nuevo o después de expansión a corto plazo *in vitro*. Los ensayos de linfocitos T pueden basarse en complejos de MHC-péptido, citocina intracelular estimulada por antígenos, u otros marcadores de superficie celular inducidos en linfocitos T activados por antígeno. El estado funcional de linfocitos T CD4⁺ se correlaciona con la presencia de diversos marcadores de superficie celular e intracelulares, por ejemplo, marcadores de activación incluyendo CD25 y CD69, o de "tolerancia" y función de linfocitos T reguladores, por ejemplo, GITR y FOXP3. La producción de citocinas tales como IFN γ , IL-4, IL-5 e IL-13, y de IL-17 se consideraría proinflamatoria

para respuestas inmunitarias proinflamatorias Th1, Th2 o Th17 clásicas. Por el contrario, la secreción de IL-10 y TGF β se asocian con respuestas inmunitarias tolerogénicas. Se esperaría que los marcadores de respuestas inmunitarias proinflamatorias se redujeran y/o los marcadores de respuestas inmunitarias tolerogénicas se reforzarían.

- 5 (c) Los efectos de los péptidos en linfocitos T CD4⁺ también pueden medirse usando mezclas de células, por ejemplo, sangre completa, PBMC, células mononucleares aisladas de tejido, o usando tejido incubado con los péptidos. Los ensayos capaces de medir proteínas individuales o múltiples o proteínas inmunológicas relevantes que codifican ARN o asociadas con enfermedad tales como citocinas y quimiocinas podrían evaluarse después de
- 10 después de la administración de gluten o péptidos en sí mismos al paciente, o ensayos múltiples de quimiocinas y citocinas usando PBMC son capaces de detectar los efectos biológicos de linfocitos T específicos de péptidos de pacientes. El efecto terapéutico de los péptidos se indicaría por un desplazamiento de los marcadores asociados con respuestas inmunitarias proinflamatorias a marcadores asociados con tolerancia inmunitaria (por ejemplo, IL-10) y reducción general en marcador proinflamatorios tales como IFN γ .
- 15 (d) Los efectos de los péptidos en el tejido pueden ser prácticos; los ensayos funcionales podrían tomar la forma de aplicación directa del péptido a la piel para evaluar la hipersensibilidad de tipo retardado, como en el ensayo de Mantoux para tuberculosis, que implica aplicación intradérmica de PPD (derivado de proteína purificada) y evaluación del diámetro de la rojez en el sitio de inyección 24-72 horas después. Los péptidos también pueden aplicarse a otros sitios de mucosa y piel para evaluar de la misma manera. En la práctica clínica, en enfermedad
- 20 celíaca es importante la respuesta inmunitaria estimulada tanto por proteína derivada de grano como por el péptido. Por ejemplo, se ha predicho que la inmunoterapia usando los péptidos seleccionados no conduciría solamente a la supresión de la respuesta inmunitaria estimulada por linfocitos T específicos para los péptidos sino que también la "tolerancia" sería "infecciosa" y también conduciría a supresión de la inmunidad proinflamatoria a otros péptidos derivados del gluten y el gluten en sí mismo. Por lo tanto, los efectos de la terapia peptídica también podrían controlarse usando gluten de diversos granos (trigo, centeno, cebada) en enfermedad celíaca, en lugar del péptido
- 25 en los ensayos descritos anteriormente. De hecho, la terapia peptídica para asma sensible a gatos se ha controlado por un ensayo cutáneo tal utilizando el antígeno de proteína completa del que derivan los péptidos terapéuticos (Oldfield *et al.*, 2002).
- (e) En última instancia, los efectos clínicos de la inmunoterapia peptídica se evaluarían por examen histológico de tejidos expuestos a gluten de la dieta, típicamente el intestino delgado, pero en situaciones experimentales también se han evaluado la mucosa oral y rectal, y en principio también podría evaluarse otros sitios tales como el esófago y el colon. Se podría recoger tejido de estos sitios por visualización directa, típicamente por biopsia endoscópica. La visualización directa por endoscopia también se ha usado para diagnosticar enfermedad celíaca de acuerdo con la
- 30 apariencia de la mucosa, puede evaluarse la atrofia vellosa por patrón así como endoscopia de cápsula y aumento. Por lo tanto, los efectos tolerogénicos de los péptidos pueden evaluarse simplemente por detección de daño al tejido macroscópico en el tracto gastrointestinal.
- (f) La inmunoglobulina específica para los péptidos u otros péptidos del gluten, o autoantígenos relevantes para la enfermedad celíaca proporcionaría marcadores de inmunidad del gluten relevantes para la actividad de enfermedad, y para la actividad de opsonización que puede comprometer los efectos terapéuticos de los péptidos en sí mismos.
- 40 (g) La presencia de marcadores asociados con anafilaxis, tales como IgE específico de péptido o gluten o liberación de histamina por basófilos de sangre periférica también puede usarse para predecir complicaciones de la inmunoterapia peptídica y es necesario ajustar o cesar la terapia.

Ensayo de alimentación

- 45 La invención también proporciona un método para determinar si una composición o alimento es capaz de provocar enfermedad celíaca, comprendiendo el método detectar la presencia del agente de la invención, el péptido de la invención y/o el polinucleótido de la invención en la composición o una muestra de alimento. Típicamente esto se realiza usando un ensayo de unión en el que uno o más compuestos que se unen con uno o más péptidos definidos
- 50 en el presente documento de una manera específica se ponen en contacto con la composición y se detecta la formación de un complejo o complejos de péptido/compuesto y se usa para evaluar la presencia del péptido o los péptidos. En un ejemplo, el compuesto es un anticuerpo. Puede usarse cualquier formato adecuado de ensayo de unión. Típicamente, el ensayo utiliza anticuerpos monoclonales para péptidos del gluten en un ELISA de tipo sándwich, no competitivo. Las muestras de alimentos pueden extraerse en primer lugar, opcionalmente diluirse y
- 55 después ensayarse en la prueba.

- La composición o el alimento típicamente comprenden material de una planta que expresa gluten. Dicho material puede ser una parte de planta, tal como un producto recolectado (por ejemplo, semilla). El material puede ser productos procesados del material vegetal, tal como una harina o alimento que comprenda gluten. El procesamiento
- 60 de material de alimento y su ensayo en pruebas de unión adecuadas es rutinario (véase por ejemplo, Kricka, 1998). La composición o el material alimentario pueden tratarse con tTG antes de ponerse en contacto con el compuesto.

- En una realización, la composición o el material alimentario se pone en contacto con al menos 2, 3, 5, 10 o más anticuerpos que son específicos para péptidos definidos en el presente documento en forma desamidada y/o no
- 65 desamidada. Preferentemente, los anticuerpos se dirigen contra secuencias que son resistentes a proteasa y permiten la detección de gliadinas α , β , γ y ω , y gluteninas LMW y HMW en trigo, hordeínas B, C y D en cebada,

secalinas β , γ y ω en centeno y opcionalmente aveninas en avena.

Pueden proporcionarse anticuerpos dirigidos contra los péptidos/epítomos definidos en el presente documento en forma de kit para su uso en un ensayo para la detección y/o cuantificación de gluten en los alimentos.

5

Identificación de proteasa

La presente invención también proporciona un método para identificar una proteasa que puede escindir un péptido como se define en el presente documento, comprendiendo el método poner en contacto el péptido con una proteasa en condiciones para efectuar la escisión específica del péptido para producir un producto proteolítico y detectar el producto proteolítico producido. En un ejemplo, el producto proteolítico se detecta, por ejemplo, usando SDS-PAGE, HPLC, ELIZA o Transferencia de Western. En un ejemplo adicional, el péptido se fusiona con un donante fluorescente y un aceptor interruptor para permitir la transferencia de energía de resonancia intramolecular entre el donante fluorescente y el aceptor interruptor. Tras la escisión, el donante y el aceptor se separan, permitiendo la detección de la emisión de fluorescencia del donante. Típicamente el péptido separa el donante fluorescente y el aceptor interruptor a una distancia de menos de aproximadamente 100 Angstrom. El donante fluorescente puede unirse con el extremo C terminal del péptido, y el aceptor interruptor puede unirse con el extremo N terminal del péptido, o viceversa.

10

15

20 Ejemplos

Ejemplo 1: determinación de péptidos inmunodominantes

Sujetos

25

Los voluntarios fueron adultos de 18-70 años de edad y que seguían una dieta estricta sin gluten. Todos los voluntarios poseían genes que codificaban tanto HLA DQAB1*05 como HLA DQB1*02 como se determinó por PCR con mezclas de cebadores específicos de secuencia de ADN de sangre periférica (Bunce *et al.*, 1995; Olerup *et al.*, 1993; Mullighan *et al.*, 1997). Se diagnosticó a los voluntarios con enfermedad celíaca basándose en los criterios de ESPGAN (Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition, 1990). Los sujetos con enfermedad celíaca que se sometían a exposición a gluten tomaban una dieta sin gluten durante al menos 1 mes y afirmaron seguirla (tTG-IgA positivo o EMA fue un motivo de exclusión). Los sujetos HLA DQ2 sanos (negativos para IgA endomisial) habían seguido una dieta sin gluten estricta durante 4 semanas antes de comenzar la exposición al gluten.

30

35

Exposición al gluten de tres días

Exposición a trigo: dos rebanadas de 50 g para el desayuno y para el almuerzo de “pan de sándwich blanco convencional” de Sainsbury (Reino Unido, para evaluar la biblioteca Piloto), o de otro modo “barra en bloque de pan blanco” de Baker's Delight.

40

Exposición a cebada: cebada perlada (Ward McKenzie, Altona, Australia) cocinada como risotto (150 g de peso seco diarios). Las raciones de risotto se dividieron en raciones iguales para el desayuno, el almuerzo y la cena.

Exposición a centeno: consumo diario de 100 g en peso seco de harina de centeno en forma de magdalenas comidas a lo largo del día comenzando en el desayuno. La harina de centeno se obtuvo bien de centeno cultivado en “aislamiento” en la estación de investigación de Long Ashton, Reino Unido, y posteriormente molido a mano (para evaluación de la biblioteca piloto), o de harina de centeno Biodynamic (Eden Valley Biodynamic Farm, Dumblebung, Australia).

45

Exposición a trigo, cebada y centeno combinada: se comieron cada día dos magdalenas consistentes en 25 g de harina de trigo (White Wings, Goodman Fielder, Australia), 22 g de harina de cebada (Four Leaf Milling, Tarlee, Australia Meridional) y 22 g de harina de centeno (Four Leaf Milling, Tarlee, Australia Meridional) cada día.

50

Antígenos

Se obtuvieron péptidos sintéticos (pureza >70%) de Research Genetics (Estados Unidos), Mimotopes (Australia), o Pepscan (Países Bajos). La desamidación con tTG de hígado de cobaya (Sigma T5398) fue como se ha descrito previamente (Anderson *et al.*, 2000). Se incubaron péptidos (2 mg/ml) o gliadina (Sigma G3375) durante 4 horas a 37 °C en un exceso de 10 veces con quimiotripsina (Sigma C3142) o tripsina (Sigma T1426) en bicarbonato de amonio (pH 8), o con pepsina (Sigma P6887) en ácido acético 5% (pH 2,5), después se neutralizaron hasta pH 7 con NaOH, y finalmente se hirvieron durante 15 minutos. Las concentraciones de proteínas prolamina se determinaron por el método de BCA (Pierce, Estados Unidos). Se prepararon fracciones de hordeína y secalina a partir de centeno y cebada cultivados en aislamiento de otros granos, harina molida a mano, y se fraccionaron de acuerdo con métodos publicados (Tatham, A. S., Gilbert, S. M., Fido R. J., y Shewry, R. Extraction, separation, and purification of wheat gluten proteins and related proteins of barley, rye, and oats. En: Marsh M, ed., Celiac disease methods and protocols. Totowa: Humana (2000) pp 55-73).

60

65

Bibliotecas de péptidos

- 5 Se diseñaron bibliotecas de péptidos de gluten de trigo, cebada y centeno por alineamiento y filogenia (biblioteca "Piloto", véase el listado de secuencias, Tablas 3 y 4, o usando un algoritmo adaptado aplicado a entradas para gliadinas, gluteninas, hordeínas y secalinas en Genbank de NCBI en 2006 en su secuencia codificada por genoma (tipo silvestre) (biblioteca "exhaustiva"), o secuencia desamidada de tTG tanto de tipo silvestre como por ordenador (biblioteca de "verificación") de acuerdo con motivos de desamidación definidos (Beissbarth, *et al.*, 2005).

Tabla 3: Bibliotecas de péptidos del gluten

	Piloto	Exhaustivo	Verificación
Biblioteca	Viabilidad de mapeo de epitopos de linfocitos T exhaustivo en enfermedad celíaca	1. Definir jerarquía e identidad de péptidos de gluten de trigo, cebada, centeno y avena estimuladores de linfocitos T; y 2. Definir compuesto candidato para vacuna terapéutica basada en péptidos para enfermedad celíaca HLA DQ2*	Definir la serie de péptidos en gluten reconocidos por clones de linfocitos T intestinales y de sangre periférica derivados de donante celíaco específicos para epitopos inmunodominantes
Uso	PBMC en ensayo de ELISpot de IFN γ de linfocitos T (policionales) extraídas el día 0 frente a día 6 de exposición al gluten de donantes del Reino Unido celíacos HLA DQ2* frente a sanos	Igual que el Piloto, pero aumentado de escala para confirmar los datos del Piloto y ensayar todas las proteínas del gluten de trigo, centeno y cebada.	Clones de linfocitos T de biopsias intestinales y de sangre periférica
Búsqueda de Base de datos de Genbank	Sept 2001 Especies: <i>T. aestivum</i> (trigo), <i>T. aestivum</i> subsp. Términos: alfa-gliadina, beta-gliadina, gamma-gliadina, omega-gliadina	Junio 2003 Especies: <i>T. aestivum</i> (trigo), <i>H. vulgare</i> (cebada), <i>S. cereale</i> (centeno) Términos: gluten, gliadina, glutenina, hordeína, secalina	Oct 2006 Especies: <i>T. aestivum</i> (trigo), <i>T. aestivum</i> subsp., <i>H. vulgare</i> (cebada), <i>S. cereale</i> (centeno) Términos: gliadina, hordeína, secalina
Resultados de la búsqueda	61 α/β , 47 γ , 3 ω -gliadinas	53 α/β , 53 γ , 2 ω -gliadinas, 77 LMW, 55 HMW gluteninas, 59 hordeínas, 14 secalinas	58 α/β , 48 γ , 5 ω -gliadinas 86 hordeínas, 16 secalinas
Diseño	Todos los péptidos de 12 unidades de tipo silvestre Alineamiento por filogenia MegaAlign ClustalW	Todos los péptidos de 12 unidades de tipo silvestre Algoritmo de biblioteca	Todos los péptidos de 10 unidades de tipo silvestre y tTG-desamidados: gliadina, hordeína, y secalina
Tamaño	652 péptidos de 20 unidades que abarcan 3997 péptidos de 12 unidades y 3372 péptidos de 9 unidades	20 unidades (12 unidades, 9 unidades) Gliadina: 721 (4465, 3739) LMW glutenina: 645 (3945, 3164) HMW glutenina: 786 (4799, 3630) Hordeína: 416 (2672, 2413) Secalina: 155(957, 811)	18 unidades (10 unidades, 9 unidades) Gliadina: 1363 (8114, 7561) Hordeína: 1338 (8557, 8117) Secalina: 327 (2105, 1955)
Extremos terminales	H $_1$, -OH(libre)	H $_1$, -OH(libre)	H $_1$, -OH(libre)
Cantidad	0,6 μ mol	1 μ mol	4x 0,5 μ mol: gliadina, hordeína, secalina
QA	2 patrones por cada 96 péptidos de 20 unidades Análisis de aminoácidos y HPLC: IKDFHVVFRESRDALWKGPG	2 patrones por cada 96 péptidos de 20 unidades Análisis de aminoácidos y HPLC: IDKFHVVFRESRDALWKGPG	Todos evaluados por LC-MS. 1320/1363 péptidos de 18 unidades de gliadina, 1311/1338 péptidos de 18 unidades de hordeína y 321/327 péptidos de 18 unidades de secalina.

	Pureza 50, 41-56 % (mediana, intervalo, n=7) VLQHHIAHGSSQVLQESTY Pureza 17, 16-23 % (n=7)	Pureza 64, 55-71 % (mediana, intervalo, n=31) Un polipéptido de 20 unidades de cada bloque de 96 Pureza 36, intervalo: 5-68 % (n=31)	Se sintetizaron secuencias de 10 unidades en 27 de 18 unidades de hordeína y 6 de secalina con masa incorrecta como 108 de 12 unidades (todas con la masa correcta)
Disolución	ACN 10 % HEPES 0,1 M	Acetonitrilo acuoso 50 %	Acetonitrilo acuoso 50 %
Reserva	10 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml

Ensayo de ELISpot

Se realizaron ensayos de ELISpot de IFN γ (Mabtech, Suecia) usando placas de 96 pocillos (MSIP-S45-10; Millipore, Bedford, MA) usando células mononucleares de sangre Periférica (PBMC) de sangre extraída entre las 8 horas y el mediodía del sexto día después de comenzar la exposición al gluten como se ha descrito previamente. Brevemente, se recubrieron placas de ELISpot con anticuerpos anticitocina de captura estéril a una concentración 1:100 (50 μ l/pocillo) diluido en PBS y envuelto en papel metálico durante una noche a 4 °C. Antes de su uso, cada placa se lavó tres veces con PBS estéril y se bloqueó la unión no específica mediante la adición de RPMI con FCS 10% (50 μ l/pocillo) durante 2 horas a 37 °C. Se añadió antígeno a concentración 5X a cada pocillo (25 μ l) seguido de adición de PBMC recién aisladas suspendidas en medio completo (100 μ l) y se incubó durante una noche (16-20 horas) a 37 °C en un incubador de CO $_2$ al 5%. Las células y el medio de cultivo se descartaron después y la placa se lavó una vez con agua destilada fría, después tres veces con PBS con Tween-20 0,05% (Sigma P2287, St Louis, Estados Unidos) y tres veces en PBS (200 μ l/pocillo cada lavado). Se incubó mAb anti citocina biotinilado (1:1000) diluido en PBS con FCS 0,5% (50 μ l/pocillo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron seis veces con PBS (200 μ l/pocillo) y se añadió estreptavidina-ALP (1:1000) (50 μ l/pocillo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadió sustrato de revelado BCIP-NBT (50 μ l/pocillo) y se permitió que los puntos se revelaran. El desarrollo se terminó lavando con agua fría cuando los puntos fueron visibles por primera vez. Se enumeró el número de unidades formadoras de puntos (UFP) en pocillos individuales con análisis de imágenes de video asistido por ordenador (AID ELISpot Reader System, AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Alemania). El derivado de proteína purificada de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD RT49) (5 μ g/ml) y/o toxoide del tétanos (CSL) (10 unidades formadoras de luz/ml) fueron antígenos de control positivo.

Aislamiento de clones de linfocitos T

Se aislaron PBMC de sangre completa heparinizada usando Ficoll-Paque Plus en tubos de Leucosep. Se aislaron células mononucleares de lámina propia (LPMC) de biopsias del intestino delgado tratando en primer lugar las muestras con DTT 1 mM en PBS, seguido de dos incubaciones a 37 °C durante 30 minutos en Dispasa II 2,4 U/ml. Las biopsias se trituraron después y se incubaron a 37 °C durante 1 hora en Liberase Blendzyme 3 2 U/ml y RPMI. Las PBMC y LPMC se lavaron tres veces en PBS. Típicamente, se recuperaron entre 0,5 y 1 x 10 6 LPMC y se mezclaron con 1,5-3 millones de PBMC autólogas irradiadas a 2000 rad.

Se tiñeron PBMC y LPMC con CFSE 0,1 μ M y se sembraron en placas de 96 pocillos a 2 x 10 5 células/pocillo, como se ha descrito previamente (Mannering *et al.*, 2003; Mannering *et al.*, 2005). Se usaron antígenos peptídicos y proteicos a 32 μ g/ml y 100 μ g/ml respectivamente. Entre 7 y 10 días después, se midió la proliferación de CD4 $^+$ por citometría de flujo (FACSaria, BD). Se clasificaron células CD4 $^+$ CFSE dim PI en un único pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía 2 x 10 5 PBMC (irradiadas a 2000 rad), 2 x 10 4 JY-EBV (irradiadas a 5000 rad), IL-2 humana recombinante 20 U/ml, IL-4 humana recombinante 5 ng/ml y anti CD3 30 ng/ml (OKT3) en medios. Las células se alimentaron cada 7 días durante 2 semanas con medio que contenía citocinas para proporcionar una concentración final de IL-2 20 U/ml e IL-4 5 ng/ml. El día 25, se identificaron clones en crecimiento y se expandieron en placas de 48 pocillos en medios que incluían IL-2 20 U/ml e IL-4 5 ng/ml. La especificidad de antígeno se determinó por ensayo de proliferación de 3 H-timidina o ELISpot de IFN γ . Se llevó a cabo expansión a gran escala de clones específicos en matraces de cultivo que contenían OKT3 30 ng/ml en 15 ml de medio con 5 x 10 7 PBMC (irradiadas con 2000 rad) y 5 x 10 6 JY-EBV (irradiadas con 5000 rad). Después de 24 horas, se añadió IL-2 a una concentración final de 50 U/ml. El día 3, la expansión se lavó y se resuspendió en 25 ml de medio que contenía IL-2 50 U/ml. El día 7, las células se dividieron por la mitad y se cubrieron con 12,5 ml de medio que contenía IL-2 a una concentración final de 50 U/ml. Las células expandidas se examinaron con respecto a la especificidad de antígenos el día 10 por ensayo de proliferación de 3 H-timidina o ELISpot de IFN γ .

Caracterización de clones de linfocitos T

Se ensayaron clones específicos de antígeno expandidos con respecto a clonalidad usando el IOTest Beta Mark (Beckman Coulter). Los clones negativos se conformaron como clonales por PCR de las cadenas V β de TCR. La restricción de HLA se determinó por anticuerpos anti HLA-DR (clon L243 10 μ g/ml) y HLA-DQ (Clon SPVL3 10 μ g/ml). La secreción de IFN γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17 por clones para antígeno afín se determinó en ensayos de ELISpot usando APC irradiadas (2000 rad) de donantes HLA DQ2 $^+$ HLA DQ8 $^-$. Las exploraciones de lisina de SEC ID N°: 228, 229 y 230 (NPL001, NPL002 y NPL003, respectivamente) se llevaron a cabo en ensayos de ELISpot o proliferación usando clones específicos para estos péptidos.

Análisis de datos

Las respuestas de ELISpot se consideraron significativas cuando las UFP fueron tanto mayores de cuatro veces en medio solamente como mayores de 10 UFP/pocillo. Los ensayos de proliferación se consideraron significativos cuando los índices de estimulación (IE) fueron mayores de 3. Los conjuntos de datos se normalizaron con respecto a variabilidad entre donantes o entre clones expresando UFP o IE como un porcentaje del péptido, grupo de péptidos o cóctel más reactivos ensayados. Se asignó a los péptidos y grupos de péptidos reactivos una

“puntuación” entre 0 y 100, igual a la respuesta normalizada media de donantes que respondían a al menos un péptido o grupo.

5 Ejemplo 2: Determinación de los péptidos dominantes primarios usando linfocitos T policlonales nuevos inducidos por exposición a gluten *in vivo*

10 En estudios previos, se ha descubierto que los linfocitos T específicos de gluten alcanzan un máximo en sangre 6 días después de que los donantes de enfermedad celíaca HLA DQ2⁺ comiencen la exposición a gluten oral. El día 6, las respuestas de ELISpot de IFN γ de PBMC de donantes con enfermedad celíaca a concentraciones óptimas de gliadina tratada con tTG (500 μ g/ml) y α -gliadina p57-73 QE65 (SEC ID N^o: 8) que abarcan los epítomos DQ2- α -I (SEC ID N^o: 3) y DQ2- α -II (SEC ID N^o: 4) se correlacionaron significativamente ($r=0,80$, $p<0,0001$). La mediana de las respuestas de ELISpot de IFN γ al péptido de 17 unidades fueron del 51% ($n=17$, intervalo: 0-155%) de las de gliadina tratada con tTG (500 μ g/ml). Sin embargo, la α -gliadina p57-73 QE65 (SEC ID N^o: 8) no siempre fue inmunodominante. Las respuestas de ELISpot de IFN γ fueron equivalentes a menos del 5% de las de gliadina tratada con tTG en 3/17 donantes (Anderson *et al.*, 2005).

20 Basándose en estas observaciones, resulta evidente que los péptidos del gluten adicionales a la α -gliadina p57-73 QE65 (SEC ID N^o: 8) y péptidos incluyendo los péptidos SEC ID N^o: 4 y/o 5 también deben estimular una población sustancial de linfocitos T inducidos por exposición al gluten *in vivo*. Los inventores no estaban seguros de que una inmunoterapia basada en péptidos que utiliza α -gliadina p57-73 QE65 (SEC ID N^o: 8) y péptidos que incluían los epítomos SEC ID N^o: 4 y/o 5 se dirigirían solos uniformemente a una proporción suficientemente grande de la población de linfocitos T específicos de gluten relevantes para la enfermedad. Los inventores plantearon la hipótesis de que la α -gliadina p57-73 QE65 (SEC ID N^o: 8) y péptidos que incluían los epítomos SEC ID N^o: 4 y/o 5 eran agonistas parciales y que las secuencias relacionadas con SEC ID N^o: 8, 4 y/o 5 estimularían sustancialmente más linfocitos T, o que péptidos adicionales que abarcaban epítomos inmunodominantes estaban presentes entre proteínas de gluten expresadas por trigo, cebada o centeno.

Búsquedas de homología

30 Casi todas las sustituciones de los cinco aminoácidos principales, PELPY (SEC ID N^o: 22) de α -gliadina p57-73 QE65 (SEC ID N^o: 8) anulan su reconocimiento por linfocitos T de sangre periférica inducidos por exposición al gluten.

35 Se buscaron en las bases de datos SwissProt y Trembl genes de cereales que codificaban péptidos de 17 unidades con la secuencia PELPY (SEC ID N^o: 22), la secuencia de tipo silvestre equivalente, PQLPY (SEC ID N^o: 23). Se descubrieron trece péptidos de 17 unidades de α -gliadina de trigo con PQLPY y uno con PQLSY (SEC ID N^o: 24) en las posiciones 8-12, pero ninguno tenía la secuencia PELPY. En referencia a la Figura 1, se muestran las respuestas de ELISpot a partir de una diversidad de péptidos de 17 unidades con los epítomos de linfocitos T DQ2- α -I (SEC ID N^o: 3), DQ2- α -II (SEC ID N^o: 4) y DQ2- α -III (SEC ID N^o: 5), que derivan de una región altamente polimórfica de la familia de α -gliadina de proteínas. Se muestran en la Figura 1 respuestas de ELISpot de IFN γ normalizadas de PBMC de 8 donantes con enfermedad celíaca (6 días después de comenzar la exposición al gluten de trigo) a catorce péptidos de 17 unidades de α -gliadina de origen natural, cada uno de los cuales incluye la secuencia central PQLPY (SEC ID N^o: 23) o PQLSY (SEC ID N^o: 24). Se evalúan los péptidos de 17 unidades con o sin pretratamiento con tTG o cuando la glutamina en la posición 9 (Q9) se reemplaza por glutamato (E9). Los datos representan la media \pm ETM de respuestas de ELISpot de donantes normalizadas frente a la de α -gliadina p57-73 QE65 (25 μ g/ml).

50 Dos péptidos de 17 unidades que diferían de la α -gliadina p57-73 QE65 (SEC ID N^o: 8) solamente por tener prolina o leucina sustituida con serina en el extremo C terminal eran tan activos como SEC ID N^o: 8 cuando se pretrataron con tTG o cuando la glutamina sustituyó al glutamato en la posición 9. Los péptidos de 17 unidades incluyendo tanto DQ2- α -II (SEC ID N^o: 4) como DQ2- α -I (SEC ID N^o: 3) o DQ2- α -III (SEC ID N^o: 5) estimulan mayores números de linfocitos T. Estos hallazgos estuvieron de acuerdo con los indicados en Arentz-Hansen *et al.*, 2000 en el que un panel de clones de linfocitos T intestinales reconocían cinco de once α -gliadinas recombinantes estructuralmente distintas, pero solamente las que incluían DQ2- α -I (SEC ID N^o: 3), DQ2- α -II (SEC ID N^o: 4) o DQ2- α -III (SEC ID N^o: 5). Varios otros polimorfismos desamidados de α -gliadina p57-73 estaban débilmente activos y uno que no estaba entre los estudiados por Arentz-Hansen *et al.*, 2000, PQQPFLPQLPYQPQS (SEC ID N^o: 25; W09), eran casi tan activos como los péptidos de 17 unidades que abarcaban DQ2- α -II (SEC ID N^o: 4) y DQ2- α -III (SEC ID N^o: 5) cuando se pretrataron con tTG o con glutamato en la posición 9, PQQPFLPELPYQPQS (SEC ID N^o: 26). Basándose en una exploración de sustitución previa de α -gliadina p57-73 QE65, los inventores emprendieron una búsqueda más permisiva de homólogos con una secuencia central PQ[ILMP][PST] (SEC ID N^o: 27) (Anderson *et al.*, 2006).

60 Se sintetizaron doce secuencias de gliadina, glutenina, hordeína y secalina pero solamente una, el péptido de ω -gliadina, AAG17702 (141-157) fue más activa que el medio solamente. Este péptido de ω -gliadina PQQPFPQQLPFPQQSE (SEC ID N^o: 28; AAD17702 (141-157)) fue $32 \pm 6\%$ tan activo como α -gliadina p57-73

QE65 cuando se pretrató con tTG o con glutamato en la posición 9, PQQPFPQPELPPFPQQSE (SEC ID N°: 29) (25 µg/ml; media±ETM, n=5 donantes).

Epítomos para clones intestinales y linfocitos T policlonales de sangre periférica inducidos por gluten in vivo

5 Los inventores evaluaron después los péptidos de 15 unidades desamidados que abarcaban epítomos presentados para clones de linfocitos T intestinales: GLIA-20 PFRPQQPYYPQ (SEC ID N°: 30) en su forma desamidada PFRPEQPYYPQ (SEC ID N°: 31), DQ2-γ-I PQQSFPQQQ (SEC ID N°: 32) en su forma desamidada PQQSFPEQE (SEC ID N°: 33), DQ2-γ-II IQPQQPAQL (SEC ID N°: 34) en su forma desamidada IQPEQPAQL (SEC ID N°: 35),
10 DQ2-γ-III QQPQQPYYPQ (SEC ID N°: 36) en su forma desamidada EQPEQPYYPE (SEC ID N°: 37), DQ2-γ-IV SQPQQQFPQ (SEC ID N°: 38) en su forma desamidada SQPEQEFPQ (SEC ID N°: 39), Glu 5 QIPQQPQQF (SEC ID N°: 40) en su forma desamidada QIPEQPQQF (SEC ID N°: 41) y Gli-156 PFSQQQQSPF (SEC ID N°: 42) en su forma desamidada PFSEQQQESPF (SEC ID N°: 43), y también DQ2-γ-V LQPQQPFPQQPQQPYYPQ (SEC ID N°: 44), y α-gliadina p31-49 LGQQQFPFPQQPYYPQ (SEC ID N°: 45) (sobre el intervalo de 0,1-100 µg/ml). En 8/9
15 donantes con enfermedad celíaca HLA DQ2, se detectaron respuestas de ELISpot de IFN_γ a gliadina desamidada (mediana 23, intervalo: 13-153 UFP/millón de PBMC). La Figura 2 muestra que 7 donantes respondieron a la variante de α-gliadina p57-73 QE65 desamidada con leucina en la posición 17 QLQFPFPQPELPPFPQQ (SEC ID N° 46) que abarcaba DQ2-α-I (SEC ID N°: 3) y DQ2-α-II (SEC ID N°: 4) (5 µM) y un péptido de 33 unidades LQLQFPFPQPELPPFPQPELPPFPQPELPPFPQ (SEC ID N°: 2; α2-gliadina 56-88 desamidada) (5 µM) que
20 abarcaba repeticiones en tándem solapantes de DQ2-α-I (SEC ID N°: 3) y DQ2-α-II (SEC ID N°: 4), y DQ2-α-III (SEC ID N°: 5). A una concentración óptima (50 µM), la diferencia entre las repuestas de ELISpot de IFN_γ estimuladas por los péptidos de 17 unidades y 33 unidades no fue significativa. Un donante respondió al péptido de 15 unidades que abarcaba DQ2-γ-IV desamidado (SEC ID N°: 39), pero ninguno de los otros nueve epítomos se reconocieron por PBMC recogidas el día 6 después de exposición a gluten de trigo.

25 Los inventores concluyeron que, en la mayoría de los individuos con enfermedad celíaca HLA DQ2⁺, los péptidos que abarcaban DQ2-α-I (SEC ID N°: 3), DQ2-α-II (SEC ID N°: 4) o el epítomo DQ2-α-III (SEC ID N°: 5) relacionado contribuyen sustancialmente a la actividad estimulante de linfocitos T de gluten *in vivo*, pero muchos otros epítomos de gluten publicados contribuyen muy poco, si lo hacen, de forma uniforme a los péptidos reconocidos por linfocitos
30 T CD4⁺ inducidos en sangre después de exposición a gluten *in vivo*. Por el contrario, otras secuencias que podrían tener actividad estimulante de T potente pueden haberse pasado por alto porque solamente una minoría de las proteínas del gluten se han evaluado sistemáticamente en ensayos funcionales. Fue necesario un nuevo enfoque para evaluar exhaustivamente los epítomos de linfocitos T candidatos en el gluten de trigo, centeno y cebada con respecto a su contribución a la respuesta de linfocitos T específicos de gluten asociada con la enfermedad celíaca.

Biblioteca de péptidos de gliadina de *Triticum aestivum* exhaustiva

En 2001, había 111 entradas en Genbank para proteínas α, γ y ω-gliadina de *T. aestivum*. Los enfoques tradicionales para mapeo de epítomos de linfocitos T CD4⁺ con péptidos de 15-20 unidades solapantes en 10-12
40 aminoácidos que abarcaban cada polipéptido habrían producido bibliotecas de un tamaño grande poco práctico para sintetizar y explorar. No obstante el análisis filogenético y el alineamiento de secuencias de gliadina por ClustalW indican similitudes de secuencia sustanciales dentro de y entre cada subfamilia filogenética de gliadinas (Anderson, 1991). El alineamiento de polipéptidos y diseño sistemático pero no asistido por ordenador indicó que una biblioteca de 652 miembros de péptidos de 20 unidades solapantes en 12 aminoácidos sería suficiente para abarcar los
45 péptidos de 12 unidades únicos en 111 entradas de gliadinas entonces presentes en Genbank (véase Tabla 3). Dividida en 83 grupos de hasta 8 péptidos con y sin pretratamiento por tTG, esta biblioteca era práctica de explorar antes y el día 6 después de la exposición a gluten (un pocillo para cada grupo) usando PBMC de 100 ml de sangre en ensayos de ELISpot de IFN_γ durante una noche. Después podría usarse una recogida adicional de 100 ml de sangre el día 7 para verificar los hallazgos y evaluar los péptidos individuales en grupos positivos.

Especificidad de enfermedad de respuestas de linfocitos T a grupos de péptidos de gliadina

En el estudio inicial, la biblioteca de gliadina piloto se evaluó usando ensayos de ELISpot durante una noche para medir las frecuencias de linfocitos T secretores de IFN_γ en sangre de donantes de enfermedad celíaca HLA-DQ2⁺DQ8⁻ en dietas sin gluten a largo plazo (GFD) (n=9) y también voluntarios HLA-DQ2⁺DQ8⁻ sanos (n=9) con
55 GFD durante 4 semanas, el suficiente tiempo para que la exposición a gluten sea capaz de inducir linfocitos T de sangre periférica en voluntarios celíacos (Anderson *et al.*, 2005). Entre los donantes sanos, los aumentos en las respuestas a tres de 83 grupos alcanzaron significación estadística después de la exposición al gluten (p<0,05, suma de rangos emparejados de Wilcoxon), pero fueron irregulares, débiles y no se vieron afectadas por desamidación (véase Figura 3).

Entre los nueve sujetos celíacos hubo 7 "sensibles" que, el día 6 después de comenzar la exposición a gluten, tuvieron al menos un grupo de péptidos que estimularon una respuesta de más de 10 UFP/pocillo y más de cuatro veces la inducida por el medio solamente ("fondo"). Comparando UFP el día 6 con el día 0 en los 9 donantes con
65 enfermedad celíaca, hubo una inducción significativa (p<0,05, suma de rangos emparejados de Wilcoxon) de una

cola) de linfocitos T específicos para 34 grupos incluyendo uno (grupo 20) que también se reconocía débilmente por donantes sanos después de exposición a gluten. Entre los donantes con enfermedad celíaca, el pretratamiento con tTG aumentó ($p < 0,05$, suma de rangos emparejados de Wilcoxon de una cola) la frecuencia de linfocitos T de sangre periférica que reconocían gliadina pretratada con quimiotripsina y también 11 de los grupos de péptidos ensayados.

5 Para definir una jerarquía basándose en la uniformidad y contribución relativa de los grupos (o en experimentos posteriores, péptidos) a la población de linfocitos T específicos de gliadina global, se calculó una "puntuación" entre 0 y 100 de acuerdo con el promedio de "sensibles", respuestas de ELISpot de IFN γ (UFP/pocillo) por encima del "fondo" el día 6 o día 7 expresado como un porcentaje de su respuesta máxima a cualquier grupo (o péptido de biblioteca).

10 A partir del total de 83 grupos tratados con tTG, 18 (22%) tuvieron una "puntuación" de más de 10 el día 6 y todos se asociaron con inducción significativa de respuestas entre el día 0 y el día 6, mientras que 5/9 y 7/12 grupos que tenían una puntuación entre 5 y 10 o entre 1 y 5, respectivamente, el día 6 se asociaron con inducción significativa de respuestas entre el día 0 y el día 6. Otros seis grupos se asociaron con inducción significativa de respuestas pero tuvieron puntuaciones menores de 1. Durante análisis posterior de bibliotecas peptídicas, se estableció una "puntuación" de 5 o más para grupos o péptidos como un valor de punto de corte arbitrario para que las respuestas de linfocitos T se consideraran "positivas" y garantizaran mapeo adicional.

15 También resultó evidente a partir de esta experiencia inicial que la utilización de grupos de péptidos de gliadina fue relativamente ineficaz ya que casi un cuarto de los grupos fueron positivos y requirieron desconvolución. En experimentos posteriores, se evaluaron péptidos individuales en lugar de grupos. Para permitir explorar tantos péptidos como fuera posible usando PBMC a partir de una única recogida de sangre de 300 ml, todos los péptidos se trataron con tTG (ya que el tratamiento de tTG nunca se asoció con reducción de respuestas de ELISpot) y las bibliotecas se exploraron solamente el día 6 o el día 0.

20 En 4/7 "sujetos sensibles", los grupos de α -gliadina 10 o 12 con péptidos de 20 unidades que abarcaban los epítomos DQ2- α -I (SEC ID N°: 3), DQ2- α -II (SEC ID N°: 4) y/o DQ2- α -III (SEC ID N°: 5) fueron los más activos, y en otros 3 sensibles, el grupo de ω -gliadina 81 fue el más activo. En general, el grupo de α -gliadina 12 tuvo la mayor puntuación (78) y a continuación estaba el grupo de ω -gliadina 81 (72). Se evaluaron péptidos tratados con tTG individuales a partir de los grupos 7-13, 42-53, 68 y 78-82 con PBMC recogidas de 5/7 sujetos sensibles el día 7 (véase Figura 4).

25 En todos los casos, varios péptidos de cada grupo fueron reactivos. Se confirmó que los péptidos que abarcaban los epítomos DQ2- α -II (SEC ID N°: 4) y DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y/o DQ2- α -III (SEC ID N°: 5) eran los cinco más activos en la biblioteca de 20 unidades de gliadina, pero cuatro péptidos de 20 unidades de ω -gliadina de los grupos 80 y 81 eran 53-65% tan activos como el péptido de 20 unidades de α -gliadina más activo. Los cuatro péptidos de 20 unidades de ω -gliadina incluían secuencias homólogas de DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y/o DQ2- α -II (SEC ID N°: 4), concretamente, QPFPQPQQPFPW (SEC ID N°: 47; W03; B01), PFPQPQQPIPV (SEC ID N°: 48; W04), QPFPQPQLPFPQ (SEC ID N°: 49; W06) abarcadas en SEC ID N°: 28, y tres incluían secuencias que se ha indicado que se reconocían por el epítomo DQ2- γ -VII QQPQQPFPQ (SEC ID N°: 50) cuando se desamidó para clones de linfocitos T intestinales específicos de EQPEQPFPQ (SEC ID N°: 51).

30 La Figura 5 muestra respuestas de ELISpot de IFN γ de PBMC de donantes con enfermedad celíaca después de exposición a trigo para mapear con precisión la región inmunogénica de PQQPQQPQQPFPQPPFPWQP (SEC ID N°: 52) (como se ha descrito previamente en el documento WO 2005/105129). Péptidos de 15 unidades tratados con transglutaminasa tisular que abarcan SEC ID N°: 52 se expresan como un porcentaje del péptido de 15 unidades más activo para cada donante (media+ETM, n=8) (A). La actividad estimulante de linfocitos T de SEC ID N°: 52 podría atribuirse casi completamente a la secuencia desamidada que abarca homólogos de DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y DQ2- α -II (SEC ID N°: 4), QPFPQPQQPFPW (SEC ID N°: 47). La Figura 5B muestra respuestas de ELISpot de IFN γ de PBMC de donantes con enfermedad celíaca después de exposición a trigo normalizadas frente a respuestas de donantes individuales máximas a la variante Q3 E10 (media+ETM, n=6). La desamidación de Q10 en QPQQPFPQPPFPWQP (SEC ID N°: 53) a QPQQPFPQPEQPFPWQP (SEC ID N°: 54) es suficiente para transmitir inmunogenicidad óptima y la secuencia doble desamidada, QPEQPFPQPEQPFPWQP (SEC ID N°: 55; W03-E7), es equivalente en bioactividad. La Figura 5C muestra respuestas de ELISpot de IFN γ de PBMC de donantes con enfermedad celíaca después de exposición a trigo (n=7), cebada (n=9) o centeno (n=10) normalizadas frente al péptido de 15 unidades sustituido con lisina más activo para donantes individuales (media+ETM). La sustitución de lisina de la secuencia PQPEQPF central (SEC ID N°: 272) de NPL002: piroEQPFPQPEQPFPWQP-amida (SEC ID N°: 229) (32 μ g/ml) anuló la bioactividad de este péptido. La preincubación de PBMC de homocigotos HLA DQA1*05 DQB1*02 y heterocigotos con anti HLA-DQ pero no -DR anuló respuestas de ELISpot de IFN γ de una noche a este péptido (datos no mostrados).

35 La jerarquía peptídica observada en el experimento inicial se verificó evaluando por separados los 652 péptidos de 20 unidades individuales en la biblioteca de Gliadina Piloto usando PBMC recogidas 6 días después de la exposición a trigo de 13 donantes HLA-DQ2*8⁺ adicionales (véase Figura 4). De nuevo no hubo ninguna clara diferencia en la

actividad entre péptidos de 20 unidades incluyendo DQ2- α -II (SEC ID N°: 4) y DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y/o DQ2- α -III (SEC ID N°: 5), lo que sugiere que los linfocitos T policlonales nuevos son en pocas ocasiones específicos para DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) pero no DQ2- α -III (SEC ID N°: 5) o viceversa.

5 Se exploraron PBMC de 6 donantes con enfermedad celíaca HLA-DQ2⁸⁺ el día 6 después de comenzar la exposición a trigo frente a cada uno de los 652 péptidos de 20 unidades individuales en la biblioteca de gliadina Piloto (véase Figura 4). Los péptidos de α -gliadina que eran más activos en donantes con enfermedad celíaca HLA-DQ2⁸⁺ también eran los más activos en 4 donantes con enfermedad celíaca HLA-DQ2⁸⁺ después de exposición a gluten.

10 Se exploraron PBMC de 6 donantes con enfermedad celíaca HLA-DQ2⁸⁺ el día 6 después de comenzar la exposición de 3 días con centeno puro frente a cada uno de los 652 péptidos de 20 unidades individuales en la biblioteca de gliadina Piloto (véase Figura 4). La jerarquía de péptidos de 20 unidades de gliadina estimulantes de linfocitos T fue sorprendentemente diferente de la observada después de exposición con trigo (véase Figura 4). Los linfocitos T medidos por el ensayo de ELISpot de IFN γ durante una noche en sangre después de exposición a centeno reconocieron en pocas ocasiones péptidos de 20 unidades que incluyen epítomos DQ2- α -I (SEC ID N°: 3), DQ2- α -II (SEC ID N°: 4), o DQ2- α -III (SEC ID N°: 5). En su lugar los péptidos de 20 unidades de ω -gliadina incluyendo QPFPQPQQPFPW (SEC ID N°: 47) y QPFPQPQQPIPV (SEC ID N°: 48) fueron inmunodominantes.

20 Esta observación sugirió que aunque los clones de linfocitos T inducidos contra gluten o gliadina de trigo desamidado *in vitro* pueden con frecuencia ser promiscuos en su reconocimiento de péptidos de gliadina inmunodominantes como se indica en Vader *et al.*, 2003, los linfocitos T policlonales nuevos inducidos por exposición a gluten *in vivo* sí diferencian entre secuencias estrechamente relacionadas. Por lo tanto, la conclusión de Vader *et al.*, 2003 de que la actividad estimulante de linfocitos T de hordeína y secalinas de cebada y centeno fue sustancialmente atribuible a las variantes desamidadas de secuencias PFPQPQQPF (SEC ID N°: 9) y PQPQQPFPQ (SEC ID N°: 11) que son homólogas de DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y DQ2- α -II (SEC ID N°: 4) no se confirmó usando PBMC nuevas de donantes con enfermedad celíaca después de exposición *in vivo* con centeno. Además, resultó evidente que una proporción sustancial de linfocitos T específicos para las secuencias dominantes QPFPQPQQPFPW (SEC ID N°: 47) y PFPQPQQPIPV (SEC ID N°: 48) inducidos por exposición a centeno *in vivo* no reconocieron los epítomos DQ2- α -I (SEC ID N°: 3), DQ2- α -II (SEC ID N°: 4), o DQ2- α -III (SEC ID N°: 5).

Además, cuando se comparó con los linfocitos T específicos para los péptidos de α y ω -gliadina inmunodominantes, los linfocitos T específicos para muchos epítomos presentados para clones de linfocitos T específicos de gliadina contribuyen poco o nada a la población de linfocitos T específicos de gliadina global presente en sangre el día 6 de la exposición a trigo (véase Figura 2). Por lo tanto, los inventores concluyeron que la inmunodominancia y la relevancia de epítomos del gluten previamente indicados para líneas de linfocitos T intestinales y clones *in vitro* frecuentemente divergen de la medida por un ensayo durante una noche de linfocitos T policlonales en sangre recién aislada de donantes con enfermedad celíaca después de exposición a gluten *in vivo*.

40 A continuación los inventores buscaron confirmar y extender la jerarquía de péptidos estimulantes de linfocitos T a todas las proteínas de gluten de trigo panificable (*T. aestivum*), cebada y centeno en donantes con enfermedad celíaca HLA-DQ2⁸⁺. Para enfrentarse al número creciente de proteínas de gluten en el Genbank del NCBI y para diseñar bibliotecas peptídicas para gluteninas LMW, gluteninas HMW, hordeínas y secalinas, los inventores han desarrollado un nuevo algoritmo para diseñar bibliotecas adaptadas de tamaño mínimo para acomodar todas las secuencias únicas de, por ejemplo, péptidos de 12 unidades dentro de péptidos más largos, por ejemplo, de 20 unidades. Beissbarth, T., *et al.*, 2005. Las bibliotecas de 20 unidades que abarcaban todos los péptidos de 12 unidades únicos permitieron evaluar el gluten de trigo con PBMC de dos muestras de sangre de 300 ml, y hordeínas y secalinas cada una con una única recogida de sangre de 300 ml. Se diseñaron bibliotecas de péptidos de 20 unidades exhaustivas y se sintetizaron como Pepsets de uso en exploración (véase Tabla 3), que abarcaban todos los péptidos de 12 unidades únicos en entradas de polipéptidos del Genbank presentes en junio de 2003 para gliadinas (108 entradas, 721 péptidos de 20 unidades que abarcaban 4465 epítomos candidatos de 12 unidades únicos), gluteninas LMW (77 entradas, 645 péptidos de 20 unidades, 3945 candidatos de 12 unidades) y gluteninas HMW (55 entradas, 786 péptidos de 20 unidades, 4799 candidatos de 12 unidades) de *T. aestivum*, hordeínas de *H. vulgare* (59 entradas, 416 péptidos de 20 unidades, 2672 candidatos de 12 unidades), y secalinas de *S. cereale* (14 entradas, 155 péptidos de 20 unidades, 957 candidatos de 12 unidades).

Se usaron PBMC de donantes con enfermedad celíaca HLA-DQ2⁸⁺ recogidos el día 6 después de comenzar la exposición a trigo de 3 días para explorar la biblioteca de gliadina tratada con tTG y la mitad de la biblioteca de glutenina LMW (n=20), y la segunda mitad de la biblioteca de glutenina LMW y biblioteca de glutenina HMW (n=26). Se usaron PBMC de 21 donantes con enfermedad celíaca 6 días después de comenzar la exposición a cebada para explorar la biblioteca de hordeína, y se usaron PBMC de 19 donantes adicionales 6 días después de comenzar la exposición a centeno para explorar la biblioteca de secalina. Las respuestas de ELISpot de IFN γ a péptidos de la biblioteca de Pepset tratados con tTG estaban por encima de los niveles de fondo en 27/46 donantes después de exposición a trigo, en 12/21 después de exposición a cebada y 8/19 después de exposición a centeno.

65

Para facilitar la selección de péptidos de 20 unidades para mapeo preciso en bibliotecas “de segundo ciclo”, los inventores adaptaron un enfoque de maximización de la expectativa (ME) usados para el análisis de datos de micromatrices (Beissbarth *et al.* (2005)). Todos los conjuntos de datos de donantes individuales se analizaron por el algoritmo de ME para derivar las variables λ y p para describir la respuesta de ELISpot de IFN γ a cada péptido de 20 unidades. La variable λ describe la fuerza relativa de la respuesta de ELISpot, y la variable p describe la proporción de donantes sensibles. Cada péptido de 20 unidades de biblioteca de primer ciclo se mapeó con precisión en bibliotecas de segundo ciclo si el producto de λp era al menos 5% del péptido de biblioteca de primer ciclo más activo para cada grano.

Se diseñaron bibliotecas de segundo ciclo reduciendo péptidos de 20 unidades seleccionados a 9 péptidos de 12 unidades solapantes. Si cualquier péptido de 12 unidades incorporaba glutamina en la posición 7 y se adaptaba al motivo de desamidación definido para tTG (QX₁PX₃, o QX₁X₂[F,Y,W,I,L,V], en la que X₁ y X₃ no son prolina) entonces se diseñó un péptido de 16 unidades, por el que el péptido de 12 unidades con glutamina en la posición 7 se flanqueó por los restos nativos en las posiciones -1 y 13 y por glicina en las posiciones -2 y 14. Esta estrategia permitió que el resto de glutamina potencialmente desamidada, central se alojara en las posiciones de anclaje 4, 6 o 7 en cualquier secuencia de unión a péptido HLA-DQ2 de 9 unidades potencial. Si los péptidos de 20 unidades seleccionados no incluían ninguna secuencia de 12 unidades con glutamina en la posición 7, entonces se sintetizaron dos péptidos de 16 unidades solapantes por 12 restos. Algunos péptidos de 16 unidades del segundo ciclo con un resto de glutamina central susceptible a desamidación mediada por tTG también se sintetizaron con glutamina reemplazada por glutamato (desamidación por ordenador).

La biblioteca de segundo ciclo de trigo consistió en 551 péptidos de 16 unidades (incluyendo 113 péptidos de 16 unidades sustituidos con glutamato) que se ensayaron usando PBMC de 34 donantes con enfermedad celíaca después de exposición a trigo (incluyendo 26 sensibles), la biblioteca de cebada tuvo ochenta y nueve péptidos de 16 unidades e incluía 9 sustituidos con glutamato que se ensayaron usando PBMC de 10 donantes con enfermedad celíaca después de exposición a cebada (incluyendo 8 sensibles), y la biblioteca de centeno tuvo sesenta y cuatro péptidos de 16 unidades e incluía 11 sustituidos con glutamato que se ensayaron usando PBMC de 11 donantes con enfermedad celíaca después de exposición a centeno (incluyendo 11 sensibles).

La jerarquía de péptidos estimulantes se demostró claramente para cada grano (véase Figura 6). Entre los 652 péptidos de 20 unidades combinados en el Piloto de gliadina y 2723 de 20 unidades en las bibliotecas Exhaustivas, 34 (1%) tuvieron una puntuación \geq a 30, 300 (9%) tuvieron una puntuación \geq 5, mientras que 2111 tuvieron una puntuación de 0. Ciento setenta y uno de los 300 (57%) péptidos de 20 unidades de primer ciclo tratados con tTG con puntuaciones de \geq 5 péptidos de 16 unidades tratados con tTG de segundo ciclo generados con puntuaciones \geq 5, y entre estos péptidos de 16 unidades de segundo ciclo hubo 89 secuencias únicas (véase Figura 7). Estas 89 secuencias estimulantes de linfocitos T confirmadas en el segundo ciclo incluyeron 32 derivadas de gliadinas, 1 de gluteninas LMW, 4 de gluteninas HMW, 30 de hordeínas y 29 de secalinas, 5 fueron comunes para familias de prolamina en dos granos diferentes y 1 estaba en tres familias de prolamina en los tres granos.

Los 89 péptidos de 16 unidades estimulantes de linfocitos T confirmados contenían prolina y/o glutamina.

La bioactividad después de desamidación de péptidos de segundo ciclo por tTG fue la misma que los péptidos de síntesis con glutamato que reemplaza restos de glutamina que se ha predicho que son susceptibles a tTG (datos no mostrados).

Fueron excepciones al requisito de desamidación los péptidos de 16 unidades de glutenina HMW estrechamente relacionados pero infrecuentemente reconocidos W21 QGQQGYYPISPQQSGQ (SEC ID N°: 91), W22 QGQPGYYPTSPQQIGQ (SEC ID N°: 92), W24 PGQQQSGYYPTSPQQS (SEC ID N°: 95), y W29 GQQQSGYYPTSPQQSG (SEC ID N°: 104), y la gliadina W36 QYEVIRSLVLRTPNM (SEC ID N°: 116). Los péptidos se consideraron “dominantes” para un donante celíaco particular si indujeron al menos 70% de la respuesta del péptido más activo en cada biblioteca para ese donante. En el segundo ciclo de trigo, centeno y cebada, diez péptidos de 16 unidades y treinta y uno de 12 unidades con secuencias sustituidas con glutamato correspondientes (SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 95, 102, 103, 104, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 209, 210) fueron dominantes en al menos 1 donante, mientras que solamente cuatro péptidos de 16 unidades y veintiuno de 12 unidades (con variantes sustituidas con glutamato correspondientes) fueron dominantes en más del 10% de los donantes (SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 80, 81, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 191, 192). Los péptidos de 16 unidades derivados de gluten, hordeína y secalina de trigo de segundo ciclo de mayor puntuación fueron dominantes en más del 50% y en general se reconocieron por más del 80% de los donantes.

La jerarquía y dominancia de péptidos estimulantes fue sorprendentemente diferente según el grano consumido (véase Figura 8). La capacidad estimulante de los péptidos que comparten el motivo de secuencia QQPFQPEQP(F,I)P(W,L,Y,Q)(Q,S) no fue específica de ningún grano, el péptido de 17 unidades de ω -gliadina

W03-E7 QPEQPFPQPEQFPWQP (SEC ID N°: 55) fue uniformemente el más activo de esta familia y es el péptido estimulante de linfocitos T dominante universal en el gluten. Otros péptidos fueron dominantes casi exclusivamente después de solamente un grano. Por ejemplo, el péptido de 17 unidades de α -gliadina QLQFPQPPELPYPQPQP (SEC ID N°: 225; que abarca SEC ID N°: 62 (W02-E7) incluyendo DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y DQ2- α -II (SEC ID N°: 4)) fue dominante solamente después de exposición a gluten de trigo, el péptido de 16 unidades de hordeína B08-E7 PQQPIPEQPQPYPQQP (SEC ID N°: 318; que abarca SEC ID N°: 127 (B06-E7)) solamente después de exposición al gluten de cebada, y la secuencia de secalina QPFPQQPEQIIPQQ (SEC ID N°: 323; que abarca SEC ID N°: 190 (R11-E7)) solamente después de exposición a gluten de centeno. Otros péptidos que incluían el motivo QPFP(W,L,Y,V,I)QPEQPFPQ indujeron respuestas relativamente más fuertes después de exposición a gluten de cebada o centeno que de trigo. La “especificidad de grano” de péptidos estimulantes de linfocitos T dominantes proporcionó una definición funcional para redundancia del reconocimiento de linfocitos T que complementa el enfoque tradicional para la determinación de reactividad cruzada basándose en clones de linfocitos T.

Se indujeron clones de linfocitos T a partir de biopsias intestinales o PBMC de donantes con enfermedad celíaca para péptidos desamidados dominantes. Los perfiles de citocinas de clones de linfocitos T fueron Th1 o Th0, y todos se restringieron a HLA-DQ2. Las secuencias centrales mínimas se determinaron usando exploraciones de lisina del péptido parental. Los clones de linfocitos T inducidos contra NPL001 (SEC ID N°: 228) fueron específicos para DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) o DQ2- α -II (SEC ID N°: 4), y contra NPL002 (SEC ID N°: 229) fueron específicos para DQ2- ω -I PFPQPEQPF (SEC ID N°: 10) o DQ2- ω -II PQPEQPFPW (SEC ID N°: 15). Clones de linfocitos T individuales inducidos contra NPL003 (SEC ID N°: 230) fueron específicos para DQ2-Hor-I PIPEQPQPY (SEC ID N°: 17), y la variante completamente desamidada de SEC ID N°: 189, piroEQPFPEQPEQIIPQQP-amida (SEC ID N°: 226; NPL004) (péptido de 9 unidades central no determinado, DQ2-SEC-I). Un clon adicional inducido contra gliadina desamidada fue específico para W11-E7 QAFPQPEQTFPH (SEC ID N°: 74) (núcleo de 9 unidades no determinado). Cada uno de los clones se exploró frente a las bibliotecas de gliadina/glutenina, hordeína y secalina tratadas con tTG de segundo ciclo y también una biblioteca de 18 unidades de verificación adicional (véase Tabla 3) que abarcaba todos los péptidos de 10 unidades únicos codificados por gliadinas de *T. aestivum*, hordeínas de *H. vulgare* y secalinas de *S. cereale* en su secuencia de tipo silvestre y con desamidación por ordenador (glutamato que reemplaza glutamina de acuerdo con el motivo de desamidación de tTG). Hubo poca reactividad cruzada de clones para péptidos estimulantes dominantes, pero una sustancial redundancia de reconocimiento de péptidos para muchos péptidos de gluten subdominantes. En total, 11 clones específicos para 6 epítomos, DQ2- α -I (SEC ID N°: 3), DQ2- α -II (SEC ID N°: 4), DQ2- ω -I (SEC ID N°: 10), DQ2- ω -II (SEC ID N°: 15), DQ2-Hor-I (SEC ID N°: 17), y DQ2-Sec-I (SEC ID N°: 226) presentes en 4 péptidos estimulantes de linfocitos T dominantes, W02-E7, W03-E7, B08-E2E7, y R11-E4E7 (SEC ID N°: 62, 55, 319, 322 respectivamente) reconocieron 22/37 secuencias de gliadina/glutenina, 26/30 secuencias de hordeína y 22/29 secuencias de secalina confirmadas como péptidos estimulantes en la Figura 7.

El ensayo de ELISpot de IFN γ usando PBMC recogidas de donantes con enfermedad celíaca HLA-DQ2⁺ después de exposición a gluten con magdalenas hechas de una mezcla igual de harina de trigo, cebada y centeno se usó para comparar la frecuencia relativa de linfocitos T específicos para W02-E7, W03-E7, B08-E2E7 y R11-E4E7 (SEC ID N°: 62, 55, 319, 322 respectivamente), junto con un péptido de gliadina dominante poco habitual atípico W36 (SEC ID N°: 116) y un homólogo de avenina de avena de Av- α 9A QYQPYEQEQPILQQ (SEC ID N°: 323; véase Figura 9A). La respuesta a la mezcla equimolar de W02-E7, W03-E7, B08-E2E7 (SEC ID N°: 62, 55, 319; Cóctel 2) a una concentración óptima no fue diferente de la mezcla de 6 péptidos, pero fue claramente mayor que W02-E7 (SEC ID N°: 62) y/o W03-E7 (SEC ID N°: 55). Cuando se evaluó el Cóctel 2 (50 μ M) después de exposición a gluten de trigo, cebada o centeno, este estimuló respuestas de ELISpot de IFN γ equivalentes a al menos dos tercios de la estimulada por concentraciones óptimas de gliadina, hordeína u ω -secalina tratadas con tTG (320 μ g/ml), respectivamente (véase Figuras 9B, C y D).

Para mejorar su estabilidad química y aumentar la resistencia a exopeptidasas, se sintetizaron péptidos como sales de acetato de N-piroglutamato “recubierto”, C-amida: péptidos de 15 unidades o 16 unidades NPL001 (SEC ID N°: 228), NPL002 (SEC ID N°: 229) y NPL003 (SEC ID N°: 230) con glutamato en sitios que se ha predicho que se desamidán por tTG. De hecho, el recubrimiento extendió las semividas de los péptidos de 10-12 minutos para péptidos libres: NPL033, NPL038 y NPL034 (SEC ID N°: 13, 320 y 321) después de inyección intradérmica de embolada de 0,9 mg en 0,1 ml en una rata adulta a 26-28 minutos con N-piroglutamato y C-amidación (SEC ID N°: 228, 229 y 230) o 19-24 minutos con N-acetilación y C-amidación (SEC ID N°: 231, 232 y 233) (véase Tabla 4). La biodisponibilidad, como se mide por análisis de área bajo la curva, también se aumentó sustancialmente en hasta treinta y cuatro veces con adición de N-piroglutamato o N-acetilo y recubrimiento de C-amidación.

Tabla 4. Farmacocinética de péptidos estimulantes de linfocitos T derivatizados.

N y C terminales libres	N-Acetilo y C-amida	N-piroGlu y C-amida
LQPFQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 13) NPL033 T1/2 10,2 minutos AUC 2618	N-Acetilo- LQPFQPELPYPQPQ-amida (SEC ID N°: 231) NPL030 T1/2 19,4 minutos AUC 43474	piroE- LQPFQPELPYPQPQ-amida (SEC ID N°: 228) NPL001 T1/2 28,20 minutos AUC 89350
PQQPFQPEQFPWQP (SEC ID N°: 320) T1/2 13,2 minutos AUC 22393	N-Acetilo- PQQPFQPEQFPWQP-amida (SEC ID N°: 232) NPL031 T1/2 22,9 minutos AUC 80263	piroE- PQQPFQPEQFPWQP-amida (SEC ID N°: 229) NPL002 T1/2 27,18 minutos AUC 81514
FPEQPIEQPQPYPQQ (SEC ID N°: 321) T1/2 12,5 minutos AUC 8206	N-Acetilo- FPEQPIEQPQPYPQQ-amida (SEC ID N°: 233) NPL032 T1/2 24,2 minutos AUC 79439	piroE- FPEQPIEQPQPYPQQ-amida (SEC ID N°: 230) NPL003 T1/2 25,98 minutos AUC 51390

T1/2 semivida y AUC área bajo la curva (biodisponibilidad) después de inyección de embolada intradérmica 0,9 mg en 0,1 ml de solución salina de mezcla equimolar de NPL001+2+3, NPL033+38+34 o NPL030+31+32

5

Los hallazgos de los inventores apoyan la noción de que los péptidos que abarcan epítomos presentes en NPL001 (SEC ID N°: 228), NPL002 (SEC ID N°: 229) y NPL003 (SEC ID N°: 230), son dominantes, no redundantes y contribuyen uniformemente con una proporción sustancial de la actividad estimulante de linfocitos T del gluten. Estos 3 péptidos o los epítomos dentro de ellos son por lo tanto probablemente críticos para el diseño de una vacuna terapéutica basada en péptidos o en diagnósticos funcionales que pueden aplicarse uniformemente a enfermedad celíaca asociada con HLA-DQ2.

10

Estos hallazgos enfatizan que los enfoques *in vitro* que se basan en la expansión de linfocitos T específicos de antígeno poco comunes frecuentemente no se traducen necesariamente a epítomos relevantes *in vivo* después de reactivación de enfermedad aguda. De hecho la mayoría de los péptidos estimulantes de linfocitos T dominantes no redundantes identificados en el presente estudio no se han descrito previamente en estudios funcionales que utilizan clones y líneas de linfocitos T. Ya que el mapeo de epítomos exhaustivo usando linfocitos T inducidos *in vivo* por el antígeno patógeno no se ha llevado a cabo previamente, este estudio proporciona el primer verdadero ensayo de un enfoque *in vitro* para mapear los epítomos relevantes para una enfermedad humana inmunitaria. La técnica anterior no describe la manera en que los péptidos estimulantes de linfocitos T dominantes no redundantes se seleccionarían para inmunoterapia basada en péptidos para maximizar el número de linfocitos T diana en el mayor número de pacientes minimizando al mismo tiempo el número de péptidos para simplificar la formulación.

15

20

Sin embargo, es probable que péptidos adicionales aumenten la capacidad estimulante de linfocitos T y uniformidad de las respuestas de linfocitos T donantes de esta mezcla después de exposición a trigo, cebada o centeno. Los péptidos de gluten con las mayores "puntuaciones" pero no reconocidos por clones de linfocitos T específicos para DQ2- α -I (SEC ID N°: 3), DQ2- α -II (SEC ID N°: 4), DQ2- ω -I (SEC ID N°: 10), DQ2- ω -II (SEC ID N°: 15), o DQ2-Hor-I (SEC ID N°: 17) tienen más probabilidad de aumentar adicionalmente la capacidad estimulante de linfocitos T de la mezcla. El aumento de la proporción de linfocitos T específicos de gluten a los que se dirige uniformemente una mezcla de péptidos probablemente mejore su utilidad terapéutica o de diagnóstico para enfermedad celíaca HLA-DQ2*8, pero también puede complicar la formulación, comprometer la estabilidad química y aumentar la probabilidad de efectos adversos.

25

30

Por otro lado, NPL001 (SEC ID N°: 228) podría sustituirse con un único péptido, por ejemplo, incluyendo la secuencia LPYPQPELPYPQ (SEC ID N°: 60; W01-E7) reconocido por clones de linfocitos T específicos para DQ2- α -I (SEC ID N°: 3) y también clones de linfocitos T DQ2- α -II (SEC ID N°: 4). Como alternativa, NPL001 (SEC ID N°: 228) podría sustituir dos péptidos separados, uno reconocido por clones de linfocitos T específicos para DQ2- α -I (SEC ID N°: 3), y el otro reconocido por clones de linfocitos T específicos para DQ2- α -II (SEC ID N°: 4). El mismo

35

principio podría aplicarse a NPL002 (SEC ID N°: 229) y NPL003 (SEC ID N°: 230). Esto podría ser ventajoso para mejorar la formulación y la estabilidad.

Ejemplo 3: NexVax2 en modelo de ratón

La administración óptima y el régimen de dosis de una vacuna terapéutica basada en péptidos para inducir tolerancia clínica al gluten y remisión de la enfermedad celíaca mientras se consume el gluten no se conoce. Sin embargo, una propiedad esencial de cualquier producto terapéutico basado en péptidos sería su capacidad para activar linfocitos T afines en el órgano diana *in vivo*.

La interacción entre NPL001 (SEC ID N°: 228) y linfocitos T afines *in vivo* se ha modelado desarrollando ratones Black-6 transgénicos que expresan HLA-DR3 y -DQ2 funcional (pero no molécula del MHC de Clase II murinas) en células presentadoras de antígenos (APC) a las que se transfieren 3×10^6 linfocitos T CD4⁺ marcados con CFSE específicos para NPL001 (Chen Z., *et al.*, 2006). El ratón donante (HH8-1) es transgénico para el receptor de linfocitos T específico de NPL001 y CD4 humano expresado en linfocitos T, y también expresa HLA-DR3 DQ2 en APC. En general el 96% de los linfocitos T CD4⁺ en el ratón HH8-1 son clonales y específicos para NPL001 (resultados no mostrados).

Cuatro días después de la administración subcutánea (en el corvejón de la pata trasera) de una mezcla equimolar de NPL001, NPL002 y NPL003 en 50 μ l de solución salina, se recogen el bazo, ganglios linfáticos mesentéricos de drenaje del intestino (MLN) y los ganglios linfáticos poplíteos de drenaje local (PLN). Se tiñen células mononucleares aisladas para hCD4, y las cadenas α y β del receptor de linfocitos T expresadas en los linfocitos T específicos para NPL001 HH8-1 (V α 8 y V β 8). Se mide la proliferación de células marcadas con CFSE transferidas como el % de células CFSE^{pos} que han experimentado una o más divisiones, como se indica por dilución de la tinción de CFSE. La Figura 10 muestra que se observa proliferación dependiente de dosis de linfocitos T específicos para NPL001 después de administración subcutánea de entre 0,9 y 30 μ g, se consigue respuesta semimáxima con 5 μ g. No se observa toxicidad clínica con estas o dosis de hasta 900 μ g, a pesar de que los linfocitos T tienen un fenotipo Th1 y secretan IFN γ tras la estimulación con NPL001.

Este modelo de ratón tiene el potencial de permitir la demostración de (i) prueba de principio, (ii) mecanismo de acción y (iii) optimización del régimen de dosis para la inducción de tolerancia después de la administración de vacuna terapéutica NexVax2 (una mezcla equimolar de NPL001, NPL002 y NPL003 en solución salina). En los estudios de ratón previos los inventores han demostrado que una única dosis de NexVax2, o el componente peptídico relevante NPL001, es bioactivo *in vivo*. La administración de NPL001 induce la proliferación de linfocitos T específicos de gliadina HH8-1 en un modelo de transferencia adoptivo a la mayor dosis para administrar en ensayos clínicos humanos de fase 1b. La respuesta a dosis para la activación de linfocitos T específicos de NPL001 transgénicos se determinó posteriormente. Basándose en estos datos preliminares, puede abordarse la capacidad de la vacuna terapéutica NexVax2 para modular las respuestas de linfocitos T específicos de gliadina y el mecanismo de acción en un modelo de ratón biológicamente relevante.

El objetivo del estudio fue determinar si la administración repetida de la vacuna terapéutica, NexVax2, usando un régimen diseñado para inducir tolerancia inmunológica es capaz de modular la respuesta de linfocitos T específicos de gliadina en un modelo de ratón de TCR-Tg específico de gliadina.

Los animales se identificaron, se asignaron a grupos experimentales y se trataron como en la Tabla 5 posterior.

Tabla 5. Asignación de animales a grupos experimentales.

Grupo	Dosis de NexVax2	Número de Dosis	Número de Ratón	Número por grupo
A	10 μ g	14 dosis diarias	5A1, 5A2	2
B	3 μ g	14 dosis diarias	5B1, 5B2	2
C	1 μ g	14 dosis diarias	5C1, 5C2	2
D	0,3 μ g	14 dosis diarias	5D1, 5D2	2
E	0 (control de solución salina)	14 dosis diarias	5E	1
F	10 μ g	1 dosis el día final de régimen de tratamiento	5F	1

La vía de administración intradérmica/subcutánea se seleccionó porque esta es la vía pretendida de administración en el ser humano. La dosificación se seleccionó para abarcar el intervalo de respuesta a dosis que dio como resultado la estimulación de todos los linfocitos T específicos de gliadina en el modelo de transferencia adoptiva (10 μ g) para dosis baja (0,3 μ g) que no dio como resultado la proliferación de linfocitos T TCR-Tg específicos de gliadina marcados con CFSE en el estudio previo (Nexpep3).

Todos los péptidos fueron de uso en GMP. Las formulaciones se prepararon por Nexpep Pty Ltd, y la concentración del péptido se ajustó con respecto a pureza. NexVax2 consiste en 3 péptidos (NPL001, NPL002 y NPL003) cada uno a 6 mg/ml en solución salina.

- 5 La dosis indicada es la cantidad de cada péptido en NexVax2, no la concentración de péptido total (es decir, 10 µg de NexVax2 contiene 10 µg de NPL001, 10 µg de NPL002 y 10 µg de NPL003). Se proporcionó NPL001 a 6 mg/ml en solución salina. Los péptidos se almacenaron a -80 °C antes de su inyección.

Animales y control

- 10 Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité de Ética Animal de la Universidad de Melbourne, N° de Registro de AEC 0707287.

- 15 Se usaron catorce ratones transgénicos hembra HH8-1 y 4 hCD4.IAE^{-/-}.DR3.DQ2 en el fondo de C57BL/6. Todos los ratones se criaron en la Universidad de Melbourne, Instalación Animal del Departamento de Microbiología e Inmunología. Los ratones se criaron con una dieta sin gluten (SF07-036) proporcionada por Specialty Feeds Pty Ltd, Perth, Australia Occidental. Cada animal se numeró por perforación de la oreja de acuerdo con el protocolo de instalación animal que lo identificó individualmente dentro del estudio y que correspondía al número de ese animal. Los animales se alojaron individualmente o en grupos de hasta 4 ratones en jaulas con techos de rejilla de acero inoxidable y fondos sólidos. Se usaron virutas de madera como lecho, y se proporcionaron pañuelos de papel para material del nido. Se proporcionó a cada jaula una botella de agua que contenía agua acidificada y una torre de piensos que contenía alimento de ratón sin gluten. La habitación se mantuvo entre 21 °C y 24 °C. El intervalo para la humedad relativa fue del 37-58%. Estuvo funcionando un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (horas de luz 0700-1900) con un mínimo de 15 cambios de aire por hora.

- 25 Se diluyó NexVax2 a 200 µg/ml en solución salina estéril, se separó en alícuotas y se almacenó a -80 °C para su uso. Para cada tratamiento, una alícuota se descongeló y se diluyó en solución salina estéril. Se inyectó a grupos de ratones hembras HH8-1 (n=2) por vía subcutánea en el flanco con 50 µl que contenían una dosis de valoración de NexVax2 (10 µg, 3 µg, 1 µg y 0,3 µg) diluida en solución salina o solamente solución salina. Se inyectó a los ratones diariamente durante 14 días. Un ratón recibió una única dosis de 10 µg de NexVax2 el último día del régimen de tratamiento.

- 30 Los ratones se controlaron diariamente con respecto a hinchazón o irritación en el sitio de inyección, síntomas de respuesta sistémica adversa (aparición encorvada o rugosa, letargo, escalofríos, moribundo). Se registraron la aparición, intensidad y duración de cualquier señal.

- 35 Se recogió una muestra de sangre del seno retroorbital antes de la administración del péptido y por función cardíaca después de eutanasia con CO₂ tras la compleción del experimento. Se almacenó sangre a 4 °C durante una noche, se retiró el coágulo y se recogió el suero después de centrifugación. Los sueros se almacenaron a -80 °C para su análisis futuro si fuera necesario.

- 40 Los ratones se sacrificaron por eutanasia con CO₂ 3 días después de la administración final del péptido y se recogieron los bazos. Se prepararon suspensiones de células individuales tamizando a través de cribas celulares de malla de nylon de 70 µm. Los glóbulos rojos se retiraron de los bazos por lisis con Tris cloruro de amonio. Se aislaron linfocitos T CD4⁺ por agotamiento negativo usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ (Miltenyi Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T específicos de gliadina se enriquecieron a partir de los bazos de 4 ratones HH8-1 sin tratamiento previo usando el mismo protocolo. Se prepararon APC a partir de los bazos de tres ratones transgénicos hCD4.IAE^{-/-}.DR3-DQ2. Se prepararon suspensiones de células individuales como anteriormente. Los esplenocitos se irradiaron con gamma (2.200 rad) antes de su uso como APC.

- 50 Las células se fenotiparon por tinción de anticuerpos y análisis de FACS. Se identificaron linfocitos T CD4⁺ específicos de gliadina tiñendo con TCR Vα8.3 y CD4 humano, y se tiñeron en su superficie con anticuerpos monoclonales anti CD25 y anti GITR. Se determinó la expresión de FoxP3 usando un kit de tinción de FoxP3 (eBiosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se fijaron en fijador de FACS (paraformaldehído 1%, glucosa 2% en PBS) y se analizaron por citometría de flujo en el LSR II (BD Bioscience). Se identificaron linfocitos T productores de IFN_γ e IL-10 mediante tinción de citocinas intracelulares después de estimulación con PMA/Ionomicina.

- 60 Brevemente, se cultivaron 1 x 10⁶ esplenocitos de ratones tratados durante 6 horas en DMEM completo (DMEM complementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol 50 µM, penicilina y estreptomina) y Brefeldina A 5 µg/ml con o sin PMA 500 ng/ml y Ionomicina 500 ng/ml. Las células se tiñeron después con respecto a las moléculas de superficie (TCR Vβ8.3 y CD4 humano), se lavaron y después se fijaron con paraformaldehído 1%/30 minutos, se lavaron dos veces y después se incubaron con anticuerpo anti IFN_γ o anti IL-10 diluido en PBS que contenía Saponina 0,2%. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en el LSR II (BD Bioscience) seleccionando en TCR Vβ8.3⁺, linfocitos CD4⁺ humanos.

65

Se cultivaron 2×10^4 linfocitos T purificados de cada ratón por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo en DMEM completo con 3×10^5 APC irradiadas con gamma en presencia o ausencia de NPL001 $2 \mu\text{g/ml}$ a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5%. Después de 72 horas de cultivo, los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80°C para análisis de la secreción de citocinas.

5 Las muestras se ensayaron con respecto a la presencia de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ de ratón por flexset de matriz de perlas citométrico (CBA, BD Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en el FACS Canto (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando software de Matrices de FCAP (BD Bioscience).

10 Los sobrenadantes de esplenocitos cultivados se ensayaron puros y a dilución 1:10. La concentración de citocinas se determinó frente a los patrones proporcionados diluidos de 2500-10 pg/ml.

15 Se cultivaron 2×10^4 linfocitos T CD4 purificados de ratones HH8-1 tratados con NexVax2 con células del bazo singénicas irradiadas (2.200 rad, 3×10^5 /pocillo) en ensayos por triplicado en presencia de péptido NPL001 0, 0,02, 0,2, 2 o $10 \mu\text{g/ml}$. Para ensayos de supresión, se cultivaron 2×10^4 linfocitos T CD4 HH8-1 sin tratamiento previo (sensibles) con un número igual (1:1) de linfocitos T CD4⁺ de ratones tratados con NexVax2, péptido NPL001 valorado y células del bazo singénicas irradiadas (2.200 rad, 3×10^5 /pocillo) en ensayos por triplicado. En un ensayo separado se cultivaron animales sensibles sin tratamiento previo con linfocitos T CD4⁺ de ratones tratados con NexVax2 a relaciones de sensible:supresor de 1:1, 3:1 y 9:1 en presencia de concentración subóptima de péptido NPL001 ($0,2 \mu\text{g/ml}$) y APC.

25 Se midió la proliferación de linfocitos T mediante la adición de $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina durante las últimas 24 horas de los cultivos de 96 horas. Los resultados se registran como cuentas por minuto (cpm), representando la media de cada triplicado representado y las barras de error la desviación típica.

30 Se extrajo ARN de 5×10^5 - 2×10^6 linfocitos T purificados de ratones tratados con NexVax2 usando el kit de extracción de ARN RNAeasy plus™ (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones el fabricante. Se almacenó ARN a -80°C para análisis futuro si se requirió.

35 Los ratones se controlaron diariamente con respecto a cualquier respuesta adversa aparente después del tratamiento. No hubo ninguna muerte no programada durante el periodo de observación. No hubo ninguna señal adversa sistémica observada en ningún animal durante el periodo de observación. Todos los ratones permanecieron aparentemente sanos, sin ningún deterioro observable en la actividad o apariencia. No se observó ninguna inflamación local en el sitio de inyección en los ratones inmunizados con péptido en solución salina o solución salina solamente.

Análisis de fenotipos

40 La inmunoterapia peptídica se ha asociado con la inducción de tolerancia periférica mediada por la inducción de linfocitos T reguladores (Treg) CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ derivados del timo o generados *de novo*. Adicionalmente, dicha inducción se asocia con la generación de linfocitos Treg inducidos por péptido secretor de IL-10. El efecto de la administración repetida de NexVax2 en el número y fenotipo de linfocitos T específicos de gliadina esplénicos se ha determinado. Los linfocitos T específicos de gliadina en el bazo se han identificado por la expresión de TCR V β 8.3 y CD4. La proporción de linfocitos T específicos de gliadina en la selección de linfocitos y el número total por bazo se ha determinado. Véase Figura 11, que muestra que la administración repetida de NexVax2 conduce a la reducción en la proporción (A) y el número (B) de linfocitos T CD4⁺ específicos de gliadina en el bazo. Se ha inyectado a los ratones transgénicos TCR específicos de gliadina HH8-1 por vía subcutánea durante 14 días la cantidad indicada de NexVax2. Los bazos se recogieron 3 días después de la inyección final, se procesaron y se tiñeron con anticuerpos para identificar linfocitos T transgénicos (V β 8.3 y hCD4). El número total de linfocitos T transgénicos se calculó a partir de los recuentos de células del bazo de células totales. Los puntos indican ratones individuales.

55 El tratamiento con dosis múltiples de NexVax2 a la mayor dosis ensayada ($10 \mu\text{g}$) dio como resultado una reducción aparente tanto de la proporción como del número de linfocitos T específicos de gliadina en aproximadamente 50-65%, lo que sugiere la muerte celular inducida por antígeno o el reclutamiento de estas células lejos del bazo.

60 Para determinar si la administración repetida de NexVax2 indujo una población de linfocitos Treg, se identificaron linfocitos T específicos de gliadina por expresión de TCR V β 8.3 y CD4 y se determinó la proporción de estos que expresan CD25 y FoxP3 (véase Figura 12A) o CD25 y GITR (véase Figura 12B). La Figura 12 muestra que la administración repetida de NexVax2 conduce a la inducción de linfocitos Treg. Se inyectó por vía subcutánea a ratones transgénicos TCR específicos de gliadina HH8-1 diariamente durante 14 días la cantidad indicada de NexVax2. Los bazos se recogieron 3 días después de la última inyección, se procesaron y se tiñeron con anticuerpos para TCR V α 8.3, CD4, CD25, FoxP3 y GITR. Se muestran representaciones de FACS de linfocitos CD4, específicos de gliadina que expresan CD25 y FoxP3 (A) o CD25 y GITR (B). El tratamiento con múltiples dosis de $10 \mu\text{g}$ o $3 \mu\text{g}$ de NexVax2 dio como resultado una proporción aumentada de linfocitos Treg específicos de gliadina en el

bazo de una manera dependiente de dosis. El Receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR) se expresa predominantemente en linfocitos Treg CD25⁺. La tinción reveló que la población CD25⁺ de linfocitos T específicos de gliadina coexpresaba GITR. El porcentaje de células GITR⁺ aumentó en proporción con la expresión de CD25 después de la administración de NexVax2.

5 Se examinó la proporción de linfocitos T específicos de gliadina con la capacidad de producir IFN γ o IL-10 directamente *ex vivo* en respuesta a una activación no específica. Los esplenocitos se cultivaron con y sin PMA/Ionomicina en presencia de Brefeldina A. La producción de IFN γ e IL-10 por linfocitos T específicos de gliadina se determinó por citometría de flujo. La Figura 13 muestra que la administración repetida de NexVax2 da como
10 resultado un aumento en la proporción de células productoras de IFN γ e IL-10 directamente *ex vivo*. Los ratones HH8-1 recibieron diariamente la administración subcutánea de 10, 3, 1 o 0,3 μ g de NexVax2 en solución salina o solución salina solamente durante 14 días, o una única administración de 10 μ g de NexVax2 el día 14. Tres días después de la última inyección, los ratones se sacrificaron y se determinó la proporción de células TCR $\nu\beta$ 8.3/hCD4⁺ esplénicas que expresan IFN γ (A) o IL-10 (B) por tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo después de
15 una incubación de 6 horas en presencia o ausencia de PMA/Ionomicina. Los puntos representan ratones individuales y la línea punteada indica la proporción de células positivas para citocinas en ratones HH8-1 sin tratamiento previo.

20 La repetición de la administración de 10 μ g de NexVax2 dio como resultado un aumento de la proporción de linfocitos T específicos de gliadina productores de IFN γ , y un aumento pequeño pero uniforme en la proporción de linfocitos T específicos de gliadina productores de IL-10. La administración repetida de 1 o 3 μ g de NexVax2 dio como resultado un aumento de la frecuencia de linfocitos T productores de IFN γ en uno de los dos ratones ensayados en cada grupo.

25 *Respuesta proliferativa a péptido*

La capacidad proliferativa de linfocitos T específicos de gliadina después de la administración repetida de NexVax 2 se examinó para determinar si estas células tienen un fenotipo anérgico. La incapacidad de proliferar *in vitro* es una característica tanto de linfocitos Treg CD25⁺/FoxP3⁺ como de linfocitos Treg inducidos por péptido productores de IL-
30 10. Esta reducción en la capacidad de proliferar es reversible mediante la adición de IL-2 a cultivos.

Se cultivan linfocitos T esplénicos CD4⁺ purificados en presencia de APC irradiadas con gamma de ratones transgénicos hCD4.IAE^{-/-}.DR3.DQ2 y concentraciones graduadas de péptido afín, NPL001. La proliferación se midió mediante la incorporación de ³H-Timidina durante las últimas 24 horas del cultivo de 4 días (véase Figura 14A). La
35 Figura 14 muestra que la capacidad proliferativa de linfocitos T específicos de gliadina para el antígeno afín se reduce después de la administración repetida de NexVax2 y se restaura en presencia de IL-2. Los ratones HH8-1 recibieron administración subcutánea diaria de 10, 3, 1 o 0,3 μ g de NexVax2 en solución salina o solución salina solamente durante 14 días, o una única administración de 10 μ g de NexVax2 el día 14. Tres días después de la inyección final, los ratones se sacrificaron y se purificaron linfocitos T CD4⁺ y se cultivaron con péptido NPL001 y
40 APC irradiadas en presencia o ausencia de IL-2 10 U/ml. Después de 72 horas, los pocillos se pulsaron con 1 μ Ci de 3H-Timidina durante 24 horas y las placas se recogieron y se contaron.

A. Respuesta proliferativa de ratones tratados con la dosis indicada de NexVax2 a péptido NPL001 0,2 μ g/ml.

45 B. Respuesta a dosis proliferativa de administración sin tratamiento previo y repetida de 10 μ g de NexVax2 a NPL001.

Las barras de error representan la desviación típica de cultivos por triplicado.

50 Los linfocitos T de ratones tratados con solución salina, sin tratamiento previo con antígeno, proliferaron bien en respuesta a NPL001, mientras que los linfocitos T de ratones tratados con NexVax2 mostraron una reducción sustancial en su capacidad para responder a NPL001, particularmente evidente a una concentración peptídica subóptima (0,2 μ g/ml). La administración repetida con 10 μ g de NexVax2 condujo a una reducción del 90-97% en la respuesta proliferativa a NPL001 0,2 μ g/ml. La reducción en la proliferación dependió de la dosis, e incluso la dosis
55 más baja administrada (0,3 μ g) dio como resultado una reducción del 20-37% en la proliferación a concentraciones peptídicas sub-óptimas. La adición de IL-2 10 U/ml a los cultivos indujo un bajo nivel de proliferación en ausencia de péptido (aproximadamente dos veces el del fondo), sin embargo en presencia del péptido el estado no sensible de linfocitos T de ratones tratados con NexVax2 se invirtió, de modo que la respuesta de ratones tratados con péptido fue el equivalente al control tratado con solución salina.

60 Se observó la incapacidad de proliferar en respuesta a administración de NexVax2 sobre una serie de dosis (véase Figura 14B). Esto fue particularmente evidente después de la administración de la dosis mayor de NexVax2 (10 μ g) y fue menos eficaz después del tratamiento con dosis de NexVax2 menores, particularmente en respuesta a estimulación con péptidos máxima (datos no mostrados).

Supresión de la activación de linfocitos T HH8-1 sin tratamiento previo

5 La incapacidad observada para proliferar podría ser el resultado un fenotipo anérgico, en el que los linfocitos T en sí mismos se han vuelto menos sensibles a la estimulación por antígeno, o debido a la presencia de una población de Treg. Por tanto, se evaluó la capacidad del tratamiento con NexVax2 para generar una población de Treg capaz de suprimir la respuesta proliferativa de linfocitos T específicos de gliadina sin tratamiento previo a péptido NPL001 en cultivo *in vitro*.

10 La Figura 15 muestra que linfocitos T de ratones tratados con NexVax2 son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T específicos de gliadina sin tratamiento previo. Los ratones HH8-1 recibieron administración subcutánea diaria de 10, 3, 1 o 0,3 µg de NexVax2 en solución salina o solución salina solamente durante 14 días, o una única administración de 10 µg de NexVax2 el día 14. Tres días después de la inyección final, se co-cultivaron linfocitos T CD4⁺ purificados de ratones tratados (supresores) con linfocitos T de ratones HH8-1 no tratados (sensibles), péptido NPL001 y APC irradiadas. Después de 72 horas, los pocillos se pulsaron con 1 µCi de 3H-Timidina durante 24 horas y las placas se recogieron y se contaron. En la Figura 15A, se co-cultivaron linfocitos T de ratones tratados con 10 µg de NexVax2 x 14 (panel izquierdo) o ratones tratados con solución salina (panel derecho) con un número igual de linfocitos T CD4⁺ HH8-1 sin tratamiento previo y péptido NPL001 valorado. En la Figura 15B, se co-cultivó un número constante de linfocitos T HH8-1 sin tratamiento previo (2 x 10⁴) con números valorados de linfocitos T tratados con NexVax2 (2 x 10000, 6,6 x 1000, 2,2 x 1000) y NPL001 0,2 µg/ml. La inhibición promedio de la proliferación de sensibles sin tratamiento previo se calculó a partir de los 2 ratones en cada grupo de tratamiento. Las barras de error representan la desviación típica de cultivos por triplicado.

25 Se co-cultivaron linfocitos T purificados de ratones tratados con NexVax2 con linfocitos T específicos de gliadina HH8-1 sin tratamiento previo a una relación 1:1 en presencia de una dosis valorada de NPL001 (véase Figura 15A) o a una relación de sensible:supresor de 1:1, 3:1 o 9:1 en presencia de NPL011 0,2 µg/ml (véase Figura 15B). Se observó supresión de la proliferación de células sensibles después de tratamiento con la administración repetida de 10 µg o 3 µg de NexVax2 y a una relación de sensible:supresor de 1:1 sobre un intervalo de concentraciones de péptidos estimulantes. Este resultado indica la presencia de una población reguladora. Dado que la fenotipación demostró un aumento de la proporción de linfocitos Treg específicos de gliadina solamente en ratones tratados con los 10 o 3 µg de NexVax2 y que los linfocitos Treg comprendían entre 7 y 18% de la población específica de gliadina total, la inhibición de la proliferación de linfocitos T HH8-1 sin tratamiento previo observada está dentro de las expectativas.

35 Perfil de citocinas después de cultivo *in vitro*

La modulación inmunitaria puede alterar el perfil de citocinas de células sensibles. Por ejemplo, se ha mostrado que la administración intranasal del péptido para generar linfocitos Treg inducidos por péptidos secretores de IL-10. El perfil de producción de citocinas por linfocitos T CD4⁺ de ratones transgénicos TCR específicos de gliadina que se habían tratado con administración repetida de cantidades graduadas de NexVax2 se examinó después de cultivo *in vitro* en presencia o ausencia de NPL001 2 µg/ml y APC singénicas irradiadas. Los sobrenadantes del día 3 de cultivo se recogieron y se evaluaron con respecto a la producción de citocinas asociadas con Th1 (IL-2, IFN γ , IL-12 y TNF α) y citocinas asociadas con Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) (véase Figura 16). La Figura 16 muestra producción de citocinas *in vitro*. Se purificaron linfocitos T CD4⁺ del bazo de ratones HH8-1 que recibieron administración subcutánea diaria de 10, 3, 1 o 0,3 µg de NexVax2 en solución salina o solución salina solamente durante 14 días, o una única administración de 10 µg de NexVax2 el día 14. Se cultivaron 3 x 10⁴ linfocitos T CD4 en presencia de 2 µg de NPL001 (■) o sin péptido (□) y 3 x 100000 APC irradiadas con gamma. Se recogió el sobrenadante a las 72 horas y se ensayó por matriz de perlas citométrica para la producción de citocinas Th1 (IL-2, IFN γ , IL-12, TNF α) y citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). Los resultados muestran la producción de citocinas promedio de los dos ratones en los grupos de tratamiento. No se detectó ninguna IL-12, IL-4 o IL-5 en los sobrenadantes de los cultivos. Se observó una reducción notable en la producción de IL-2, IFN γ y TNF α a partir de los cultivos de ratones que recibieron administración repetida de 10 µg de NexVax2. Esta reducción en la producción de citocinas refleja estrechamente la respuesta proliferativa reducida al péptido NPL001 en cultivo. Además los linfocitos T de ratones que recibieron inyecciones repetidas de 10 µg de NexVax2 produjeron un aumento de 3,5 veces de la cantidad de IL-10 después de estimulación del péptido *in vitro*, lo que sugiere un sesgo potencial hacia un fenotipo de Treg productor de IL-10 en estos ratones.

60 Este experimento se ha diseñado para determinar si la administración repetida de la vacuna terapéutica NexVax2, usando un régimen diseñado para inducir tolerancia inmunológica, es capaz de modular la respuesta de linfocitos T específica de gliadina en un modelo de ratón transgénico para el receptor de linfocitos T específico de gliadina. Se administró NexVax2 mediante inyección subcutánea de péptido en solución salina durante 14 días consecutivos. Este tratamiento dio como resultado en primer lugar una reducción aparente del número de linfocitos T específicos de gliadina en el bazo. Los linfocitos T restantes mostraron una reducción de su respuesta proliferativa a su antígeno afín, que se invirtió en presencia de IL-2 lo que sugiere un fenotipo "anérgico" o la presencia de una población de Treg. Esta respuesta proliferativa reducida se vio acompañada de una reducción de la cantidad de citocinas Th1

5 producidas en cultivo, y de un aumento en la producción de IL-10. También se observó un aumento en las células productoras de IL-10 específicas de gliadina directamente *ex vivo* junto con un aumento del número total y la proporción de linfocitos Treg FoxP3⁺, GITR⁺. En experimentos de co-cultivo, los linfocitos T de ratones tratados fueron capaces de suprimir la respuesta proliferativa de linfocitos T específicos de gliadina sin tratamiento previo que respondían al péptido NPL001.

10 La administración repetida de NexVax2 a la mayor dosis ensayada (10 µg por día, durante 14 días consecutivos) demostró la modulación de la respuesta de linfocitos T específicos de gliadina de ratones transgénicos para el receptor de linfocitos T específicos de gliadina tratados.

Los resultados proporcionan pruebas de que la administración subcutánea del péptido NexVax2 en solución salina es capaz de modificar la respuesta de linfocitos T al péptido de gliadina inmunodominante usando un modelo de ratón transgénico para TCR biológicamente relevante.

15 **Ejemplo 4: Vacuna de NexVax2 para enfermedad celíaca humana**

La vacuna de NexVax2 se preparó en forma de GMP para administración a pacientes humanos con enfermedad celíaca.

20 *Estudio de Fase I para determinar la seguridad, tolerabilidad y bioactividad de NexVax2 en voluntarios HLA-DQ2⁺ con enfermedad celíaca después de una dieta sin gluten estricta, a largo plazo.*

Objetivos

25 El objetivo primario de este estudio fue:

- Evaluar la seguridad y tolerabilidad de inyecciones semanales de NexVax2 administrado por vía intradérmica durante 3 semanas.

30 Los objetivos secundarios de este estudio fueron:

- Determinar la bioactividad de NexVax2 después de 3 dosis semanales en voluntarios con enfermedad celíaca mediante la medición de la respuesta de linfocitos T como se evalúa por la frecuencia de linfocitos T y liberación de citocinas.
- Determinar la bioactividad de NexVax2 después de 3 dosis semanales en voluntarios con enfermedad celíaca mediante la medición de la respuesta sintomática después de exposición al gluten.
- Medir la farmacocinética de NexVax2 después de una única inyección intradérmica en voluntarios con enfermedad celíaca.
- Medir la inducción de anticuerpos específicos para NexVax2 seguido de 3 dosis semanales en voluntarios con enfermedad celíaca.

45 *Diseño del estudio*

Un estudio de aumento de dosis, controlado por placebo, de un único centro, de Fase I, de la seguridad, tolerabilidad y bioactividad de NexVax2 en voluntarios con enfermedad celíaca cuando se administró semanalmente mediante inyección intradérmica.

50 Se requirió que los pacientes con enfermedad celíaca acudieran a nueve visitas externas. Esto incluyó tres visitas de 8 horas para recibir las inyecciones intradérmicas de NexVax2 (durante 3 semanas) y tres visitas de 6 horas para someterse a una exposición al gluten convencional.

55 Los voluntarios permanecieron en el estudio durante aproximadamente 25 días desde la fecha de la primera inyección.

Población de estudio

60 Individuos con un diagnóstico de enfermedad celíaca de acuerdo con los criterios de diagnóstico de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica aceptados (Walker-Smith *et al.*, 1990) que seguían una dieta sin gluten estricta, que poseían genes que codificaban HLA-DQ2 (DQA1*05 y DQB1*02) pero no HLA-DQ8 (DQA1*03 y DQB1*0302).

65 *Formulación de ensayo para NexVax2*

NexVax2 para inyección contenía una mezcla equimolar (0,159 μmol por cada 100 μl , aprox. 3 mg/ml) de cada uno de NPL001, NPL002 y NPL003 en una solución estéril salina normal 0,9% proporcionada por Nexpep Pty Ltd.

Formulación de placebo

5 Solución salina normal estéril 0,9% proporcionada por Nexpep Pty Ltd.

Tratamientos de estudio

10 *Cohorte 1:* que comprende 2 centinelas, 1 dosificado con 9 μg de NexVax2 por inyección intradérmica y 1 dosificado con placebo y 6 sujetos adicionales, 5 dosificados con 9 μg de NexVax2 y 1 dosificado con placebo los días 1, 8 y 15.

15 *Cohorte 2:* como la Cohorte 1 pero se dosificó a los sujetos con 30 μg de NexVax2

Cohorte 3: como la Cohorte 1 pero se dosificó a los sujetos con 90 μg de NexVax2

Cohorte 4: como la Cohorte 1 pero se dosificó a los sujetos con 60 μg de NexVax2

20 *Programa para dosificación, comidas y recogida de sangre*

Después de ayunar desde medianoche la noche antes de la administración del fármaco del estudio, el programa para administración de dosis, comidas, evaluaciones farmacodinámicas, exposición al gluten y recogida de sangre (suponiendo un tiempo de dosificación de 0800 horas) fue como se muestra en la Figura 17.

25 *Evaluaciones*

30 • Se controló la frecuencia cardíaca en reposo, la presión sanguínea sistólica/diastólica semi-supina, la frecuencia respiratoria y la temperatura: en Exploración; concretamente a las 0700 horas antes de recibir el tratamiento los días 1, 8 y 15 y a las 4 horas después de la dosis; y los días 22, 23 y 24 antes de recibir la exposición al gluten y el día 25 al final del estudio.

35 • Se recogieron muestras de sangre para ensayo de ELISpot de IFN γ de PBMC para enumerar la frecuencia de linfocitos T específicos de NexVax2 los días 1, 6, 15, 20 y 25 (Final del Estudio).

• Se recogieron muestras de sangre para análisis de Bioplex para determinar la liberación de citocinas de PBMC en respuesta a NexVax2 los días 1, 6, 15, 20 y 25 (Final del Estudio).

40 • Se recogieron PBMC los días 1, 6, 15, 20 y 25 (Final del Estudio) y se congelaron para ensayo posterior de la función de linfocitos T.

• Se recogió suero los días 1 y 20 para evaluación de anticuerpos específicos para NexVax2.

45 • Se recogieron muestras de sangre para muestreo farmacocinético el día 15 antes de la dosis y a los 15, 30, 45, 60, 75, 90 minutos, 2 horas y 3 horas después de la dosis.

50 • Se realizaron medidas de laboratorio clínico (bioquímica, análisis de orina y hematología): en Exploración; los días 1, 8 y 15 antes de la dosis y 4 h después de la dosis; y antes de la exposición al gluten los días 20 y 22, y después de la exposición al gluten y el día 25 (Final del Estudio).

• Se realizó una prueba de embarazo (orina) en la Exploración, antes de la dosis el día 1, 8 y 15 y antes de la exposición al gluten los días 20, 21 y 22 y al final de estudio (día 25).

55 • Se realizó una prueba de drogas de abuso en orina en la Exploración y antes de la dosis los días 1, 8 y 15.

• Se realizaron ECG: en Exploración; concretamente a las 0700 horas antes de recibir el tratamiento los días 1, 8 y 15 y a las 4 horas después de la dosis; y los días 20, 21 y 22 antes de recibir la exposición al gluten y el día 25 al final del estudio.

60 *Análisis de datos*

Exploración, conformidad y datos de seguridad

65 La demografía se presentará en tablas y se resumirá. Se enumerará el examen físico (incluyendo la altura y el peso) en la línea basal y el seguimiento y los datos históricos quirúrgicos/médicos en la línea basal. Se enumerarán todos

los datos de seguridad y tolerabilidad clínicos para cada sujeto.

Los valores de laboratorio fuera de los intervalos normales de laboratorio se enumerarán por separado, con comentarios acerca de su significación clínica. Los valores repetidos asociados se enumerarán juntos. Las medidas de los signos vitales (frecuencia cardíaca en reposo, presión sanguínea sistólica/diastólica semi-supina, frecuencia respiratoria, temperatura) y los parámetros de ECG se presentarán en tablas y se resumirán.

Datos de tolerabilidad

Los acontecimientos adversos causados por el tratamiento se enumerarán y se resumirán. Todos los acontecimientos adversos presentados en este estudio se codificarán usando MedDRA.

Ensayos inmunológicos

Los inventores consideran que un único tratamiento de NexVax2 aumentará la frecuencia de linfocitos T específicos de NexVax2 en PBMC y aumentará la secreción de citocinas y quimiocinas por células mononucleares.

Los inventores consideran que las PBMC extraídas después de inyección repetida (3 a la semana) de NexVax2 tendrán una menor frecuencia de linfocitos T específicos de NexVax2 que las anteriores al tratamiento.

Los inventores consideran que en comparación con los voluntarios con enfermedad celíaca tratados con placebo, la inyección repetida (3 a la semana) de NexVax2 reducirá la frecuencia de linfocitos T específicos para NexVax2 y secreción de citocinas estimulada por NexVax2 en PBMC recogidas 6 días después de comenzar la exposición al gluten oral de 3 días con pan blanco.

Los datos ordinales se analizarán por ensayo de suma de rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas de una cola. Los datos distribuidos normalmente se analizarán por ensayo de t para muestras relacionadas. Un p-valor < 0,05 se considerará significativo.

Cualquier análisis de los documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva es solamente para el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe interpretarse como una admisión de que ninguna de estas materias forma parte de la base técnica anterior o eran conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

REFERENCIAS

- Anderson, *Plant Mol. Biol.* (1991) 16: 335-337
 Anderson *et al.*, *Nature Medicine* (2000) 6: 337-342
 Anderson *et al.*, *Gut* (2005) 54:1217-1223
 Anderson *et al.*, *Gut* (2006) 55: 485-91
 Arentz-Hansen *et al.*, *J. Exp. Med* (2000) 191: 603-612
 Beissbarth *et al.*, *Bioinformatics* (2005) 21 Supl. 1: i29-37
 Briggs *et al.*, *Science* (1986) 234: 47-52
 Bunce *et al.*, *Tissue Antigens* (1995) 46: 355-367
 Chen *et al.*, *J. Immunol.* (2006) 168(6): 3050-6
 Deshpande *et al.*, *J. Biol. Chem* (1997) 272(16): 10664-10668
 Li *et al.*, *Nat. Biotechnol.* (1999) 17(3): 241-245
 Kang *et al.*, *J. Immunol.* (2008) 180: 5172-6
 Kricka, *Biolumin. Chemilumin* (1998) 13: 189-93
 Klein *et al.*, *Exp. Neurol.* (1998) 150: 183-194
 Mannering *et al.*, *J. Immunol. Methods* (2003) 283: 173-83
 Mannering *et al.*, *J. Immunol. Methods* (2005) 298: 83-92
 Mitchell y Tjian, *Science* (1989) 245: 371-378
 Mullighan *et al.*, *Tissue Antigens* (1997) 50: 688-692
 Nettelbeck *et al.*, *Gene Ther.* (1998) 5(12):1656-1664
 Oldfield *et al.*, *Lancet* (2002) 360: 47-53
 Olerup *et al.*, *Tissue Antigens* (1993) 41: 119-134
 Pitluk *et al.*, *J. Virol* (1991) 65: 6661-6670
 Stewart *et al.*, *Genomics* (1996) 37(1): 68-76
 Vader *et al.*, *Gastroenterology* (2003) 125: 1105-1113
 Walker-Smith *et al.*, *Arch. Dis. Child* (1990) 65: 909-911
 Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition (Informe de), *Arch. Dis. Child* (1990) 65: 909-11
 Zolotukiin *et al.*, *J. Virol* (1996) 70(7): 4646-4654

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

- 5 i) un primer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos: LQFPQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 13), un fragmento biológicamente activo del mismo de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o una variante biológicamente activa del mismo que no tiene más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva,
- 10 ii) un segundo péptido que comprende la secuencia de aminoácidos: QFPQPEQFPWQP (SEC ID N°: 14), un fragmento biológicamente activo del mismo de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o una variante biológicamente activa del mismo que no tiene más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, y
- 15 iii) un tercer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos: PEQPIEQPQYPQQ (SEC ID N°: 16), un fragmento biológicamente activo del mismo de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o una variante biológicamente activa del mismo que no tiene más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que

- 25 (a) el segundo péptido comprende la secuencia de aminoácidos PQFPQPEQFPWQP (SEC ID N°: 320), un fragmento biológicamente activo del mismo de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o una variante biológicamente activa del mismo que no tiene más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva y/o el tercer péptido comprende la secuencia de aminoácidos FPEQPIEQPQYPQQ (SEC ID N°: 321), un fragmento biológicamente activo del mismo de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o una variante biológicamente activa del mismo que no tiene más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva;
- 30 (b) los primer, segundo y/o tercer péptidos comprenden un grupo acetilo o grupo piroglutamato N terminal, y/o un grupo amida C terminal, preferentemente un grupo piroglutamato N terminal y un grupo amida C terminal;
- 35 (c) los primer, segundo y/o tercer péptidos se conjugan con un compuesto, en el que el compuesto es preferentemente un adyuvante, o una molécula del MHC o fragmento de unión de la misma;
- 40 (d) dos o tres de los primer, segundo y/o tercer péptidos, fragmentos biológicamente activos de los mismos de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaces de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o variantes biológicamente activas de los mismos que no tienen más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, están en una única cadena polipeptídica; y/o
- 45 (e) dicha composición comprende uno o más péptidos adicionales que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 95, 102, 103, 104, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 209 y 210.

3. Una composición que comprende uno o más polinucleótidos que codifican:

- 55 i) un primer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos LQFPQPELPYPQPQ (SEC ID N°: 13), un fragmento biológicamente activo del mismo de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o una variante biológicamente activa del mismo que no tiene más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva,
- 60 ii) un segundo péptido que comprende la secuencia de aminoácidos QFPQPEQFPWQP (SEC ID N°: 14), un fragmento biológicamente activo del mismo de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o una variante biológicamente activa del mismo que no tiene más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva; y
- 65

- 5 iii) un tercer péptido que comprende la secuencia de aminoácidos PEQPIEQPQPYPQQ (SEC ID N°: 16), un fragmento biológicamente activo del mismo de no menos de 7 aminoácidos de longitud y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten igual o mayor que el péptido del que deriva, o una variante biológicamente activa del mismo que no tiene más de 3 variaciones de aminoácidos en comparación con el péptido del que deriva y capaz de generar una respuesta de linfocitos T en un sujeto sensible al gluten mayor o igual que el péptido del que deriva.
- 10 4. La composición de la reivindicación 3, que comprende además uno o más polinucleótidos que codifican uno o más péptidos adicionales que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 95, 102, 103, 104, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 209 y 210.
- 15 5. Una composición que comprende
- i) un primer péptido como se ha definido en la reivindicación 1 o un polinucleótido que codifica el primer péptido como se ha definido en la reivindicación 1,
- ii) un segundo péptido como se ha definido en la reivindicación 1 o un polinucleótido que codifica el segundo péptido como se ha definido en la reivindicación 1, y
- 20 iii) un tercer péptido como se ha definido en la reivindicación 1 o un polinucleótido que codifica el tercer péptido como se ha definido en la reivindicación 1.
- 25 6. Una vacuna que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La vacuna de la reivindicación 6, que comprende además un adyuvante.
- 30 8. Una célula presentadora de antígenos aislada que comprende los péptidos, el polinucleótido o los polinucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. La célula presentadora de antígenos aislada de la reivindicación 8, en la que la célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica, macrófago, linfocito B o una célula endotelial sinusoide del hígado.
- 35 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la vacuna de la reivindicación 6 o 7 y/o la célula presentadora de antígenos de la reivindicación 8 o 9, para su uso en:
- (a) un método para modular una respuesta de linfocitos T a un péptido del gluten en un sujeto que es sensible al gluten;
- 40 (b) un método para inducir tolerancia inmunitaria a un péptido del gluten en un sujeto que es sensible al gluten;
- (c) un método para tratar la enfermedad celíaca en un sujeto que es sensible al gluten; o
- (d) un método para modificar la secreción de citocinas en un sujeto que es sensible al gluten.
- 45 11. Una composición, vacuna y/o célula presentadora de antígenos de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en un método como se ha definido en la reivindicación 10, en el que la secreción de interleucina-2 (IL-2), interferón gamma (IFN γ) y/o factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) se reduce y/o la secreción de interleucina-10 (IL-10) se aumenta en el método.
- 50 12. Un método para diagnosticar la enfermedad celíaca en un sujeto, controlar la progresión de la enfermedad celíaca, o determinar la eficacia de un método como se ha definido en la reivindicación 10 u 11, comprendiendo el método poner en contacto una muestra del sujeto con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o la vacuna de la reivindicación 6 o 7, y determinar *in vitro* si uno o más de los péptidos se unen con linfocitos T en la muestra, en el que la unión de uno o más de los péptidos con linfocitos T indica que el sujeto tiene, o es susceptible de, enfermedad celíaca.
- 55 13. Un kit para llevar a cabo el método de la reivindicación 12, comprendiendo el kit la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y/o la vacuna de la reivindicación 6 o 7, y medios para detectar la unión de uno o más de los péptidos con linfocitos T.
- 60 14. Un método para producir la célula presentadora de antígenos de la reivindicación 8 o 9, comprendiendo el método
- i) obtener una célula presentadora de antígenos, y
- ii) poner en contacto la célula *in vitro* con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y/o la vacuna de la reivindicación 6 o 7.
- 65

15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la vacuna de la reivindicación 6 o 7 y/o la célula presentadora de antígenos de la reivindicación 8 o 9 para uso en diagnóstico o terapia.

5 16. Un método para preparar la vacuna de la reivindicación 6 o 7, comprendiendo el método combinar los primer, segundo y tercer péptidos, fragmentos biológicamente activos, o variantes biológicamente activas, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 17. El método de la reivindicación 16, en el que el método comprende además combinar uno o más péptidos adicionales que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 95, 102, 103, 104, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 209 y 210.

15 18. El método de la reivindicación 16 o 17, en el que el método comprende además combinar un adyuvante.

19. Un método para determinar si otra composición o un alimento es capaz de provocar enfermedad celíaca, comprendiendo el método detectar la presencia de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la otra composición o el alimento.

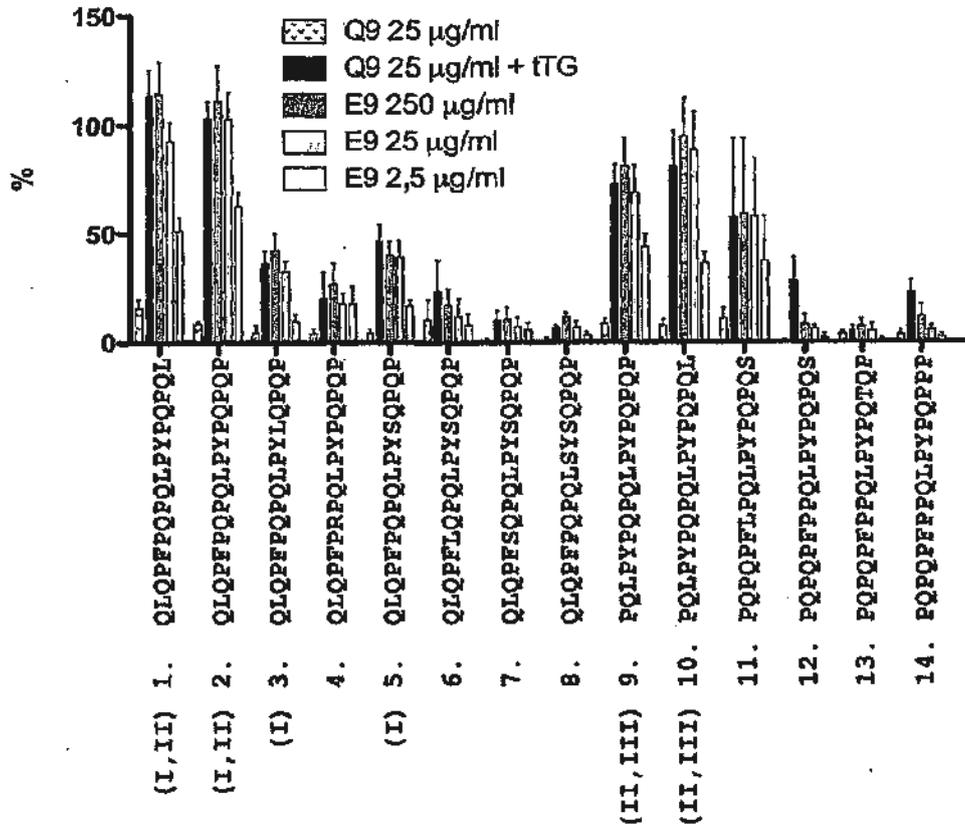


Figura 1

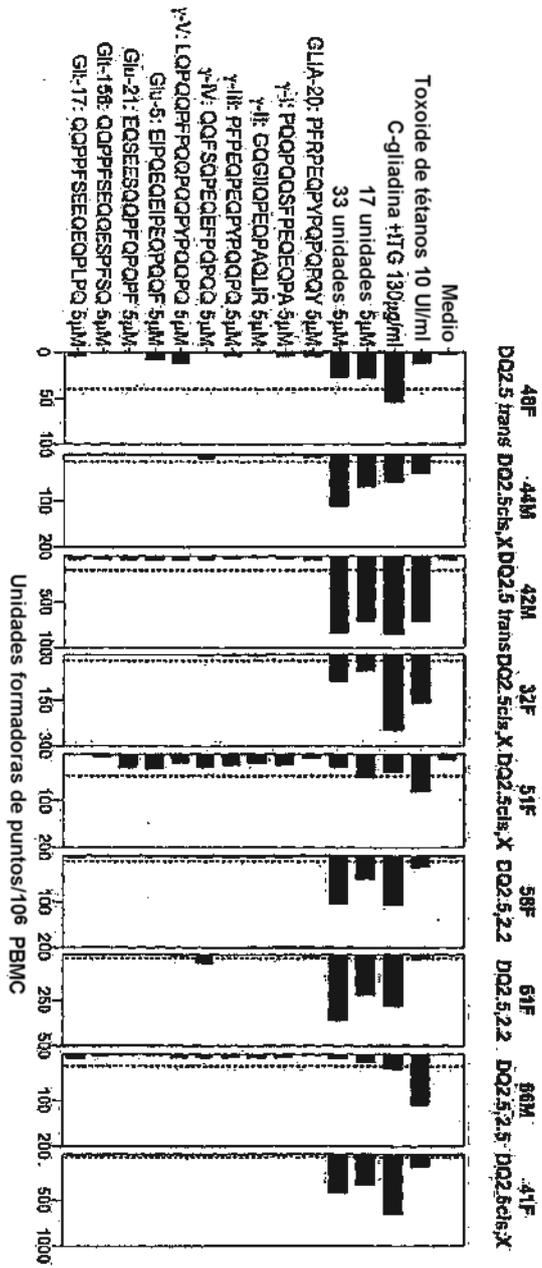


Figura 2

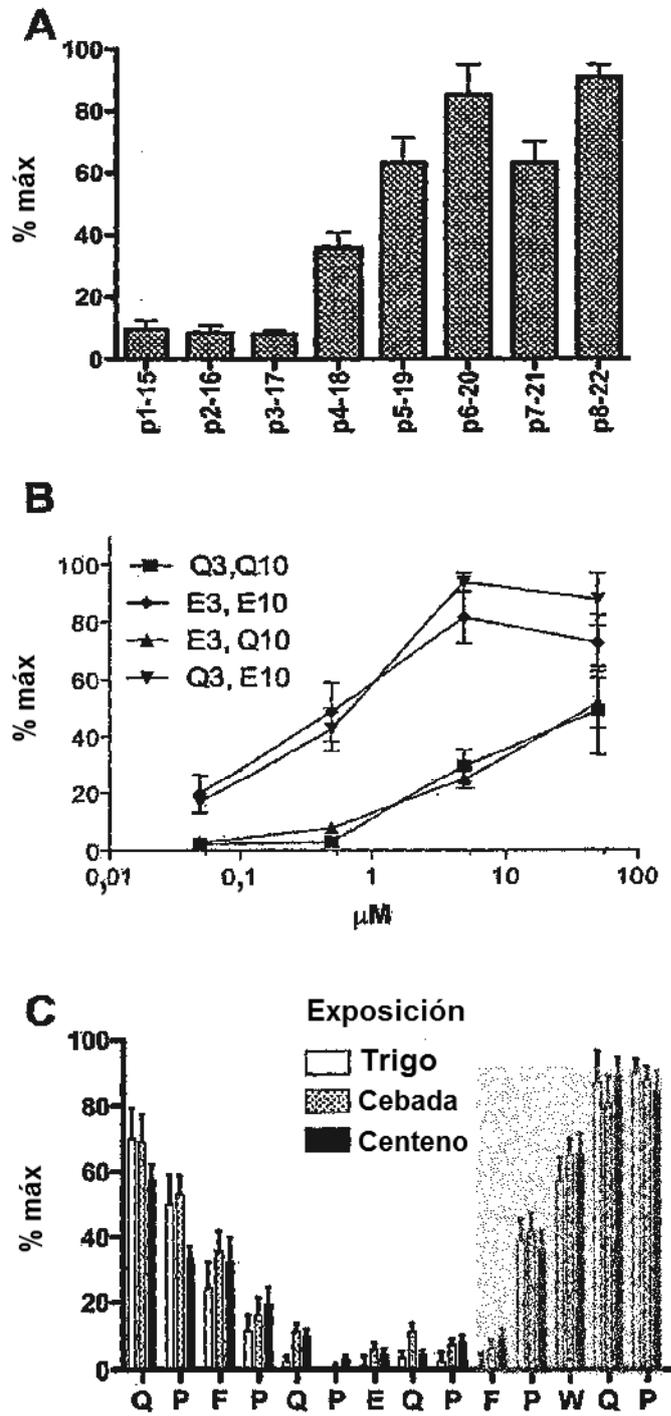


Figura 5

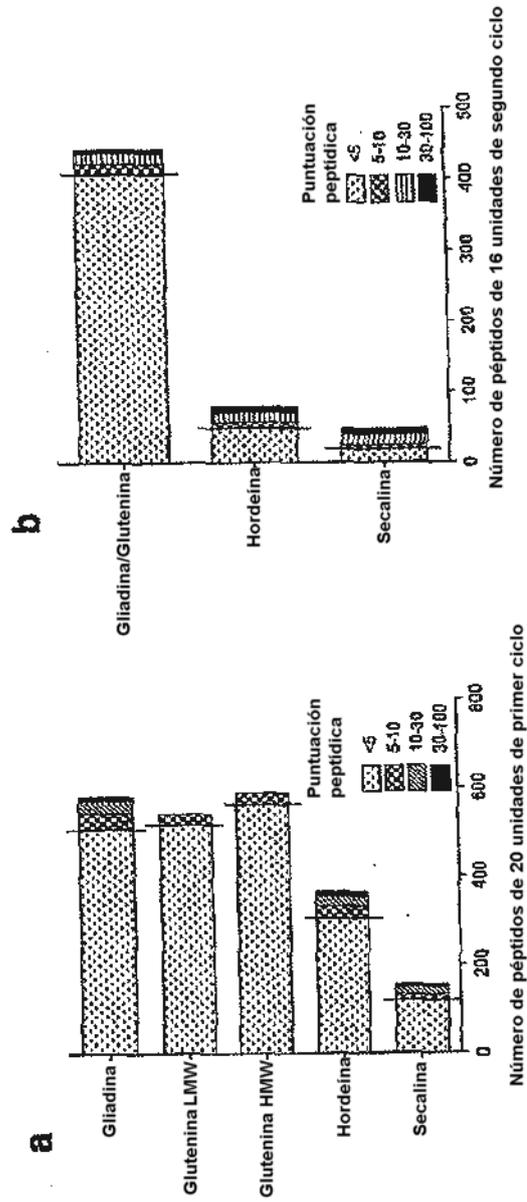


Figura 6

Identificador de núcleo*	Péptido de 20 unidades 1º ciclo		Puntuación de 1º ciclo		2º ciclo		TCC, % de UPP de ELISpot de IEN-γ para ligando afin³												Epítomos de gluten definidos o predichos⁴
	[núcleo de 2º ciclo]	Res¹	Puntuación	Res²	Don¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
B01	QEFPPQDFEWFQDFEFC	50	66	88	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ω-1
B02	WQKQDFEWFQDFEFC	53	64	75	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ω-1
B03	QEQDFEWFQDFEFC	32	55	75	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QDFPQDFE
B04	QEQDFEWFQDFEFC	38	45	63	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B05	EQDFEWFQDFEFC	38	43	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B06	QEQDFEWFQDFEFC	63	40	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B07	CSQDFEWFQDFEFC	8	37	63	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B08	QDFEWFQDFEFC	38	33	38	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B09	QDFEWFQDFEFC	28	32	63	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B10	QDFEWFQDFEFC	39	27	50	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B11	QDFEWFQDFEFC	39	26	50	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B12	QDFEWFQDFEFC	26	23	50	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B13	QDFEWFQDFEFC	19	21	50	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B14	QDFEWFQDFEFC	22	19	38	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B15	YDFEWFQDFEFC	41	16	38	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B16	QDFEWFQDFEFC	41	16	38	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B17	QDFEWFQDFEFC	38	15	38	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B18	QDFEWFQDFEFC	7	14	38	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B19	QDFEWFQDFEFC	14	13	38	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B20	QDFEWFQDFEFC	13	12	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B21	QDFEWFQDFEFC	19	10	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B22	QDFEWFQDFEFC	6	10	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B23	QDFEWFQDFEFC	9	10	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B24	QDFEWFQDFEFC	8	9	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B25	QDFEWFQDFEFC	19	8	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B26	QDFEWFQDFEFC	7	7	13	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B27	QDFEWFQDFEFC	18	7	13	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B28	QDFEWFQDFEFC	10	6	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B29	QDFEWFQDFEFC	8	6	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE
B30	QDFEWFQDFEFC	26	5	25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Her-1 QDFPQDFE, PFFPQDFE, QDFPQDFE

Figura 7B

Identificador de núcleo 2	Péptido de 20 unidades de 1º ciclo [núcleo de 2º ciclo]	Puntuación		TCC, % de UFP de ELISpot de IFN-γ para ligando afín ³												Epitopos de gluten definidos o predichos ⁴		
		1º ciclo	2º ciclo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
R01	QSLPQPPQPPQPPQ	48	82	67	82	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPQPPQ
R02	STPQPPQPPQPPQ	30	82	64	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Hc2/Sa2, Hc9/Sa9 (a-1)
R03	QPPQPPQPPQPPQ	51	91	62	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PPQPPQPPQ, PPQPPQ
R04	QPPQPPQPPQPPQ	51	73	29	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R05	PPQPPQPPQPPQ	18	55	23	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R06	PPQPPQPPQPPQ	42	82	34	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R07	QPPQPPQPPQPPQ	19	84	27	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R08	QPPQPPQPPQPPQ	14	32	70	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R09	QPPQPPQPPQPPQ	48	23	23	73	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R10	PPQPPQPPQPPQ	29	26	45	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R11	PPQPPQPPQPPQ	42	24	55	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R12	PPQPPQPPQPPQ	29	47	80	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R13	PPQPPQPPQPPQ	11	18	64	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R14	PPQPPQPPQPPQ	33	17	64	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R15	PPQPPQPPQPPQ	25	15	64	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R16	PPQPPQPPQPPQ	42	14	55	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R17	PPQPPQPPQPPQ	24	14	55	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R18	PPQPPQPPQPPQ	9	13	55	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R19	PPQPPQPPQPPQ	33	13	55	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R20	PPQPPQPPQPPQ	10	12	45	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R21	PPQPPQPPQPPQ	10	11	36	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R22	PPQPPQPPQPPQ	64	13	36	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R23	PPQPPQPPQPPQ	49	11	55	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R24	PPQPPQPPQPPQ	21	11	64	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R25	PPQPPQPPQPPQ	6	9	45	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R26	PPQPPQPPQPPQ	18	9	55	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R27	PPQPPQPPQPPQ	7	6	27	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R28	PPQPPQPPQPPQ	11	6	36	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ
R29	PPQPPQPPQPPQ	9	5	40	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	QPPQPPQ

Figura 7C

1. Péptido de 20 unidades de biblioteca de primer ciclo con una "puntuación" de > 5 confirmada por el péptido de 16 unidades de 2º ciclo (péptido de 12 unidades central en negrita) con una puntuación > 5 usando PBMC del día 6 después de exposición a gluten.

2. Reconocimiento determinado por clones de linfocitos T inducidos para el ligando afín e incubados con péptidos de 2º ciclo y biblioteca "verificación" (26 g/ml).

3. Epitopos establecidos

4. "Res" es el % de donantes de segundo ciclo que responden a péptido de 16 unidades tratados con ITG > 4X, medio solamente y al menos 10 UFS/pocillo.

5. "Dom" es el % de donantes de 2º ciclo con respuesta a péptido de 16 unidades tratado con ITG > 70% de respuesta máxima a cualquier péptido de 16 unidades tratado con ITG de 2º ciclo

6. La codificación de color representa la respuesta de IFN-γ de un clon al péptido de segundo ciclo, expresado con un porcentaje de la respuesta al ligando afín

7. Secuencias centrales duplicadas: W03 y B01, W19 y B19, W25 y R04, W26 y B20, W30 y R26, W32, B25 y R26.

W (gladina de trigo, a no ser que se indique LMW o HMW), B (Cebada), R (Centeno), Epitopos: I, PPQPPQPPQ, a-1, PPQPPQPPQ, b-1, PPQPPQPPQ, b-2, PPQPPQPPQ, Hc4, PPQPPQPPQ

Leyenda para las figuras 7A-7C

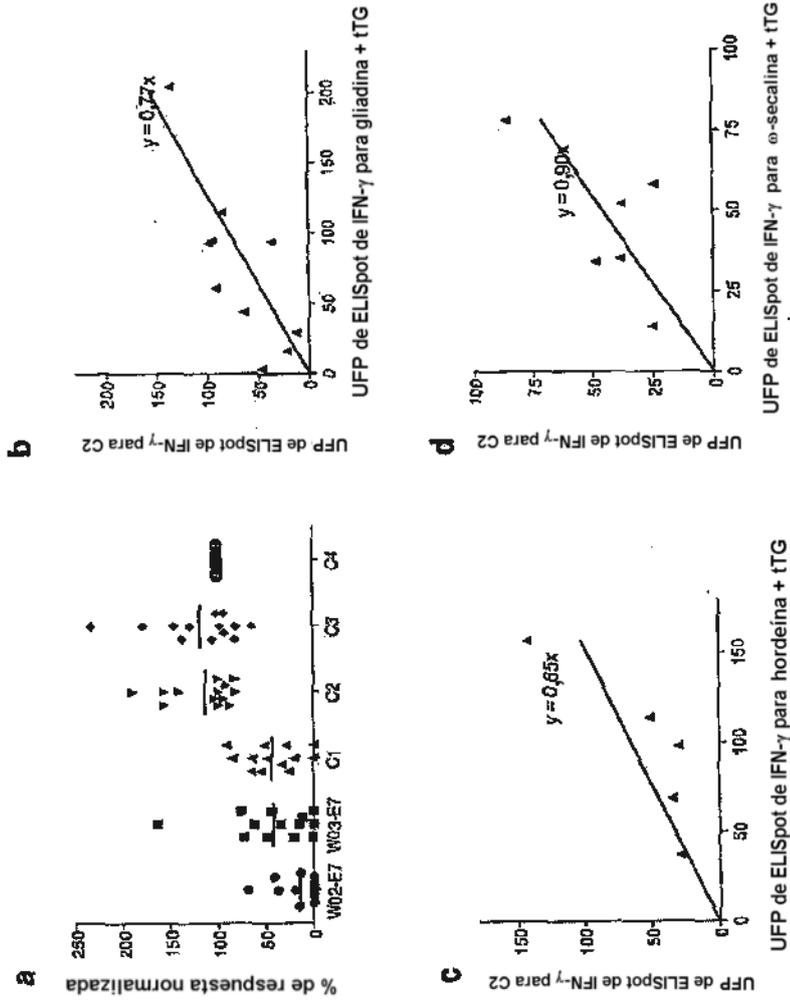


Figura 9

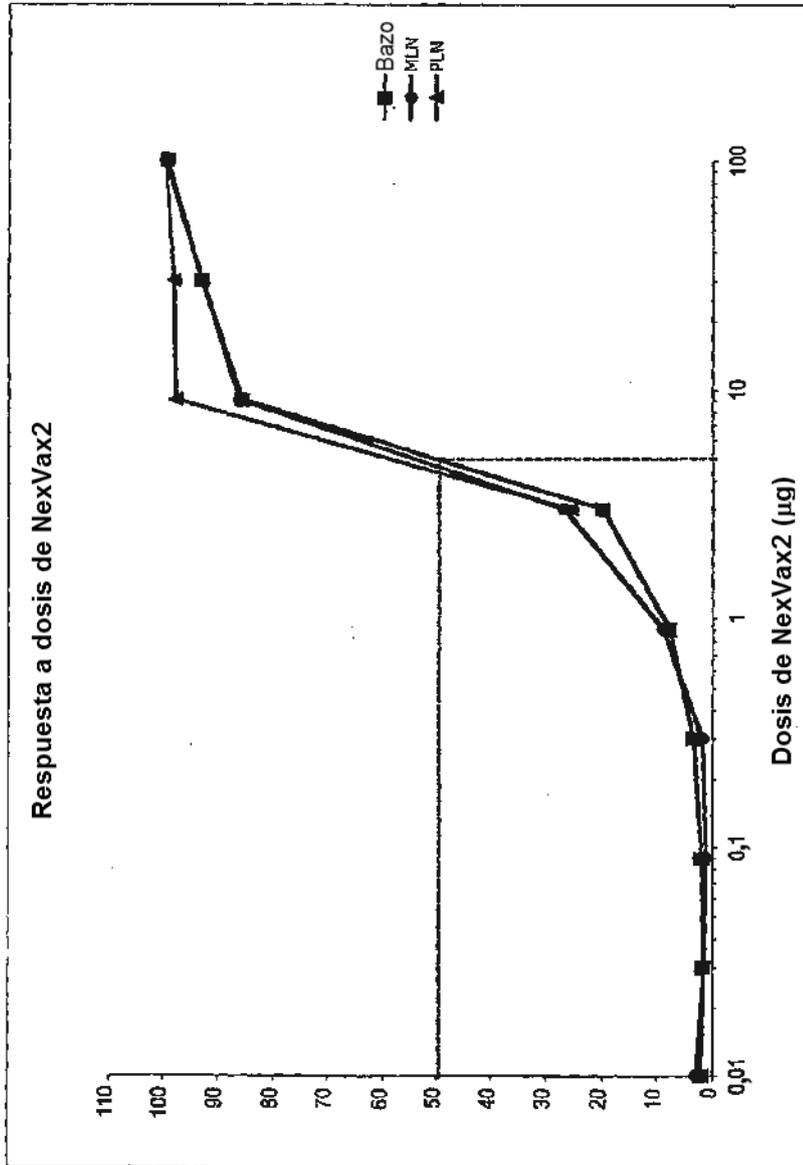


Figura 10

Figura 11A

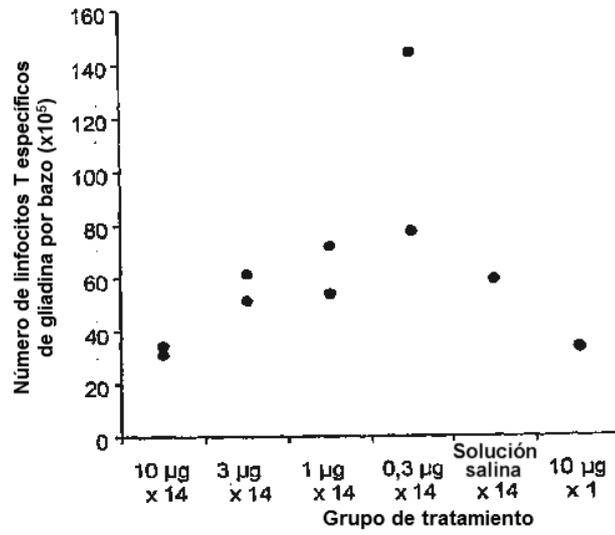
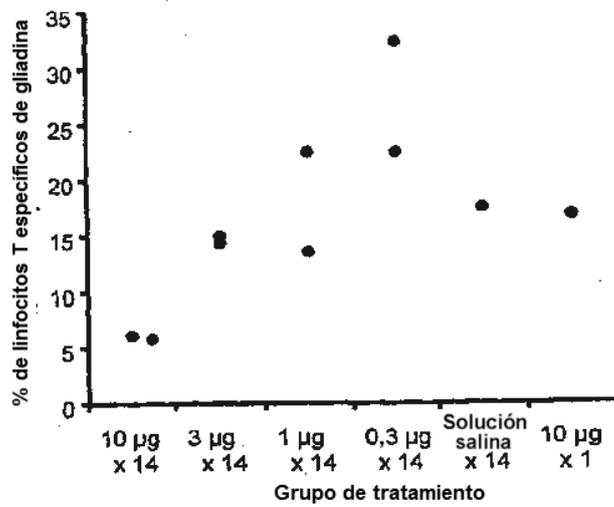


Figura 11B



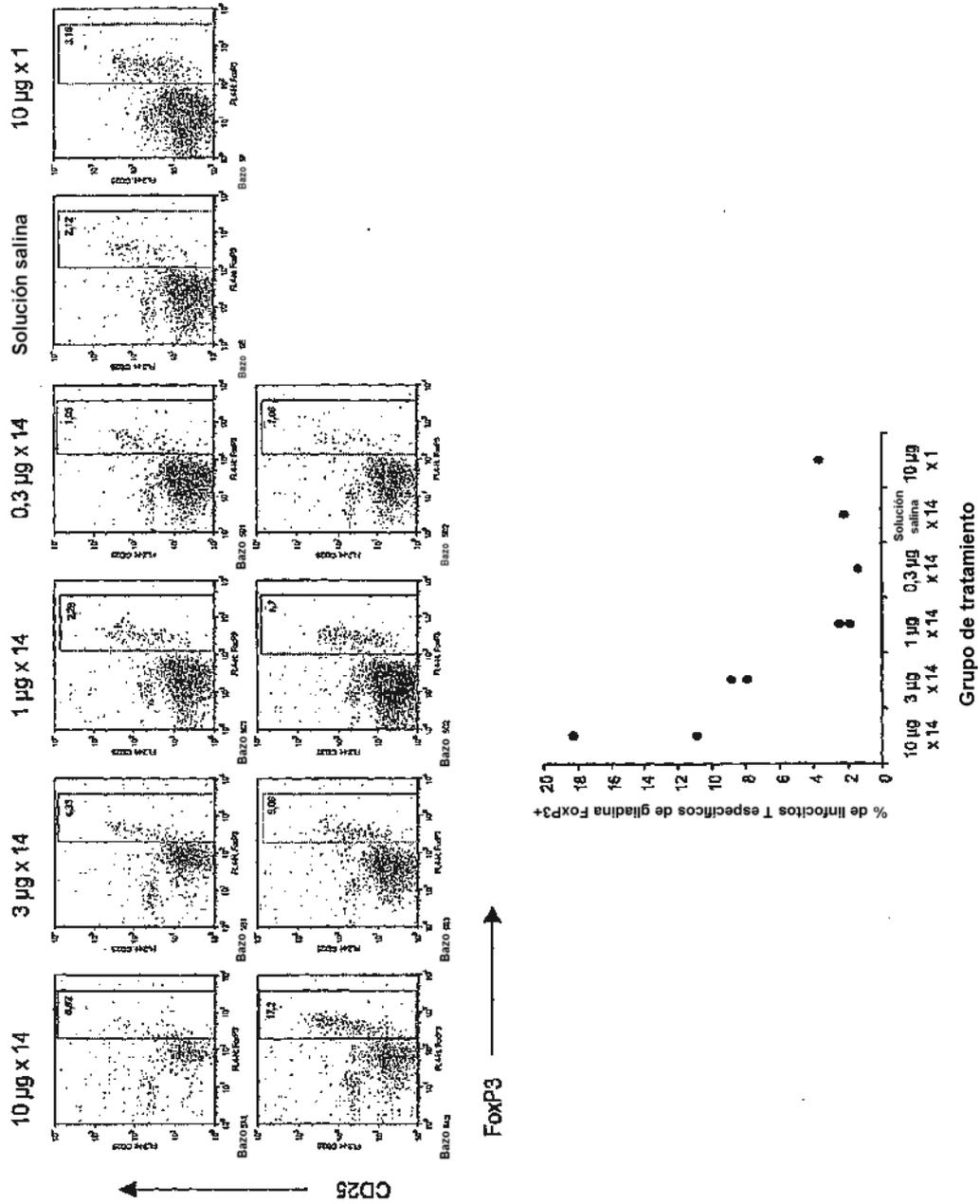


Figura 12A

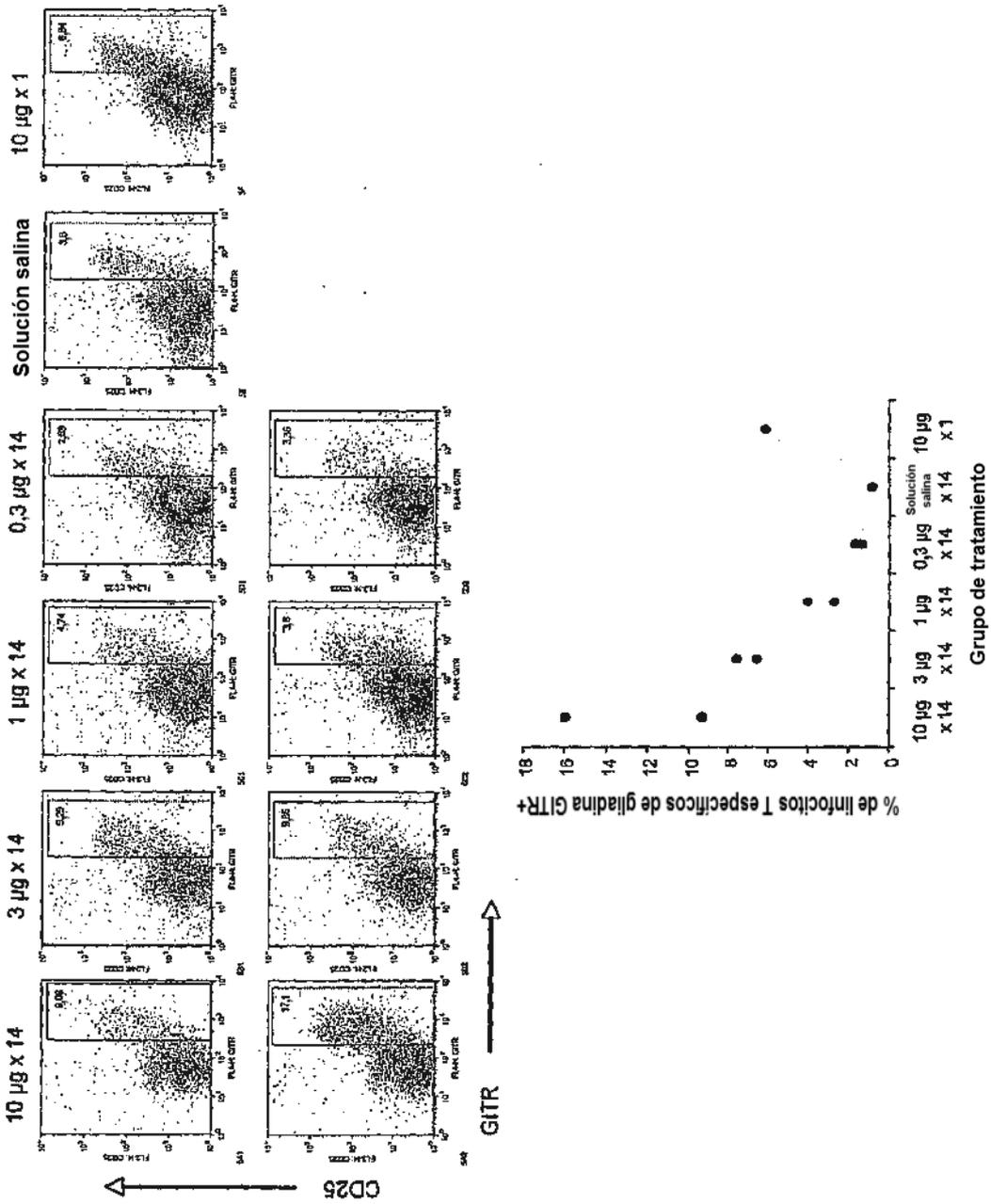


Figura 12B

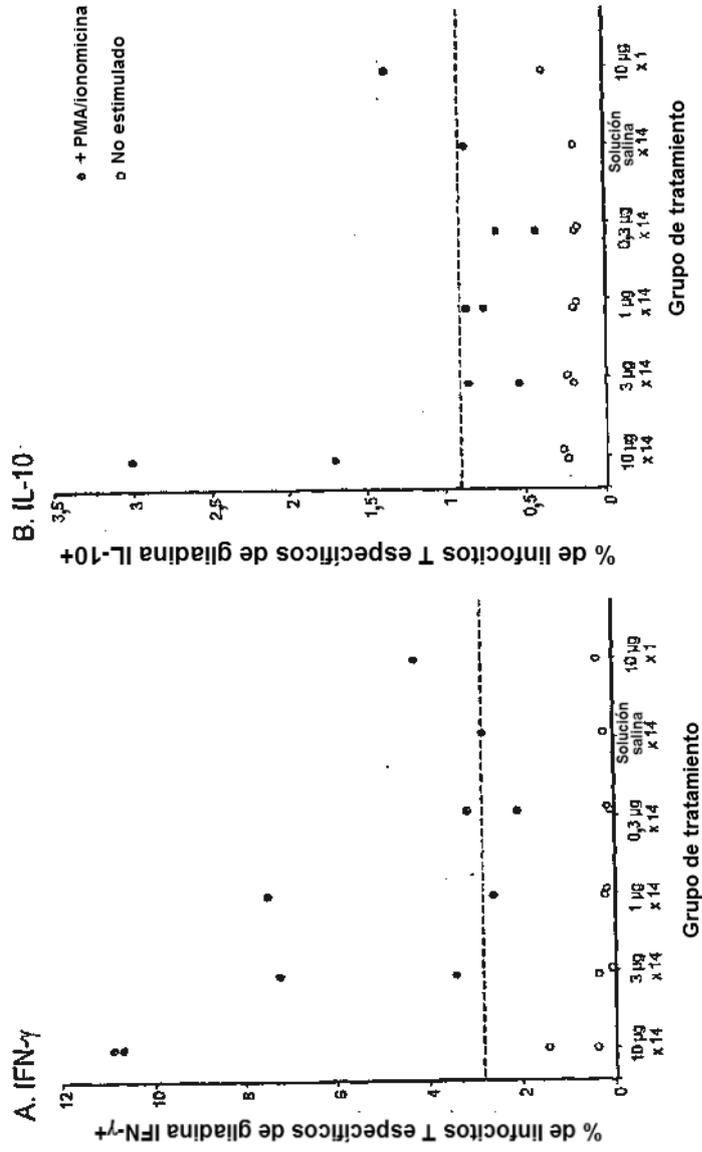


Figura 13

Figura 14A

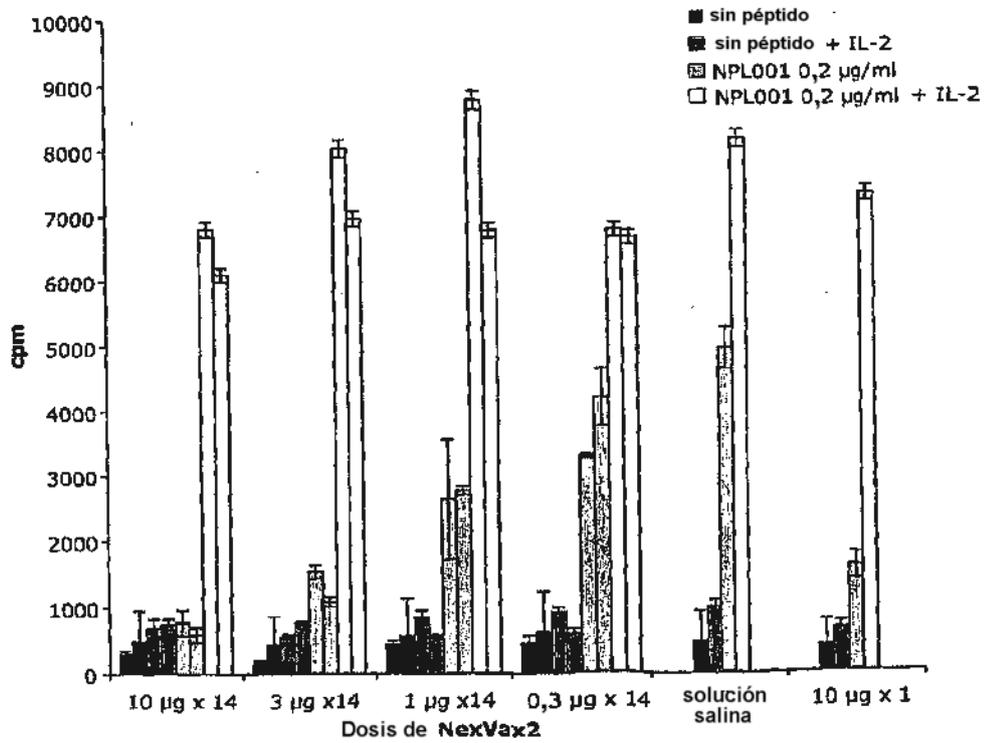
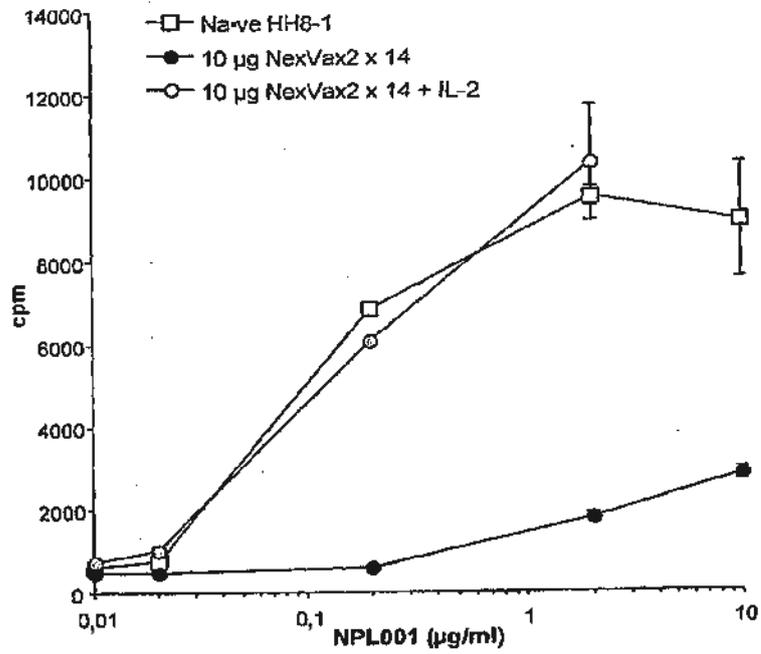


Figura 15A

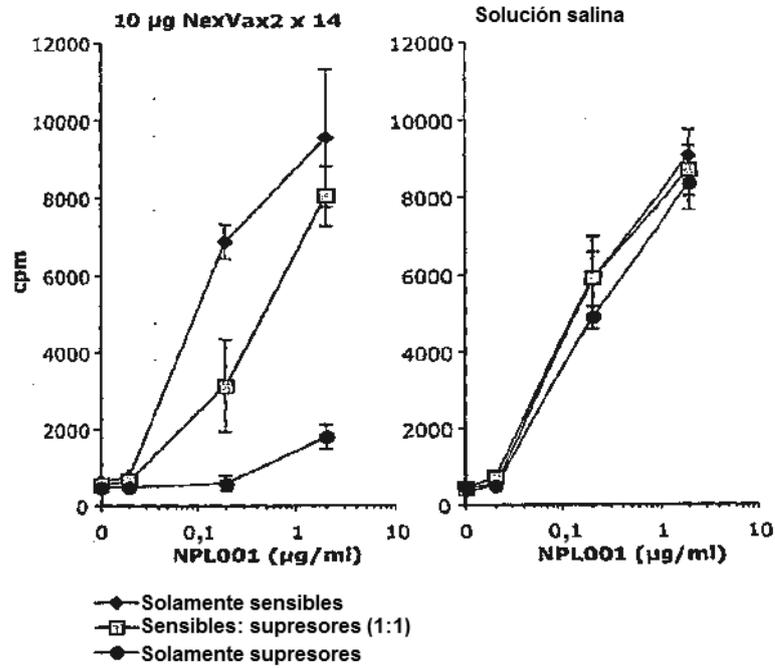
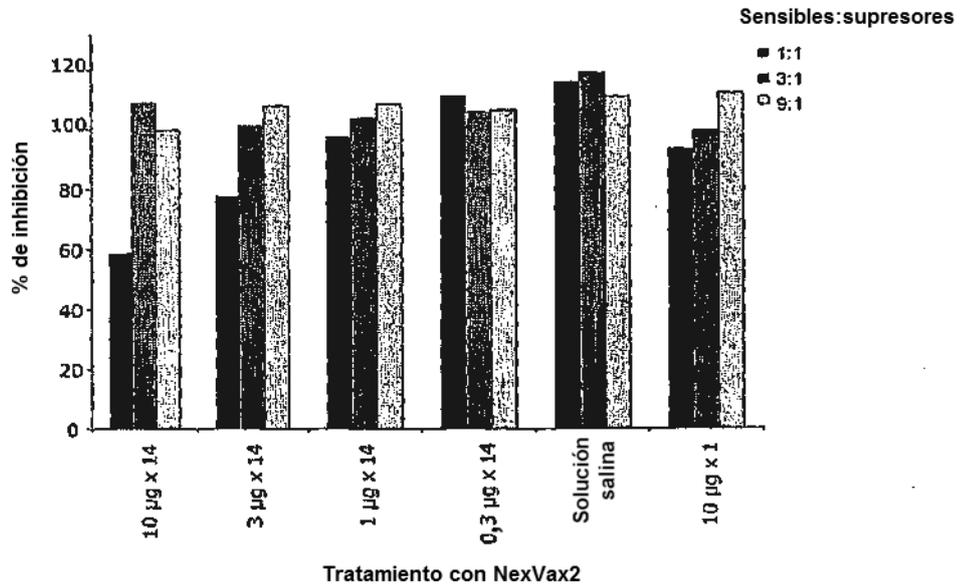


Figura 15B



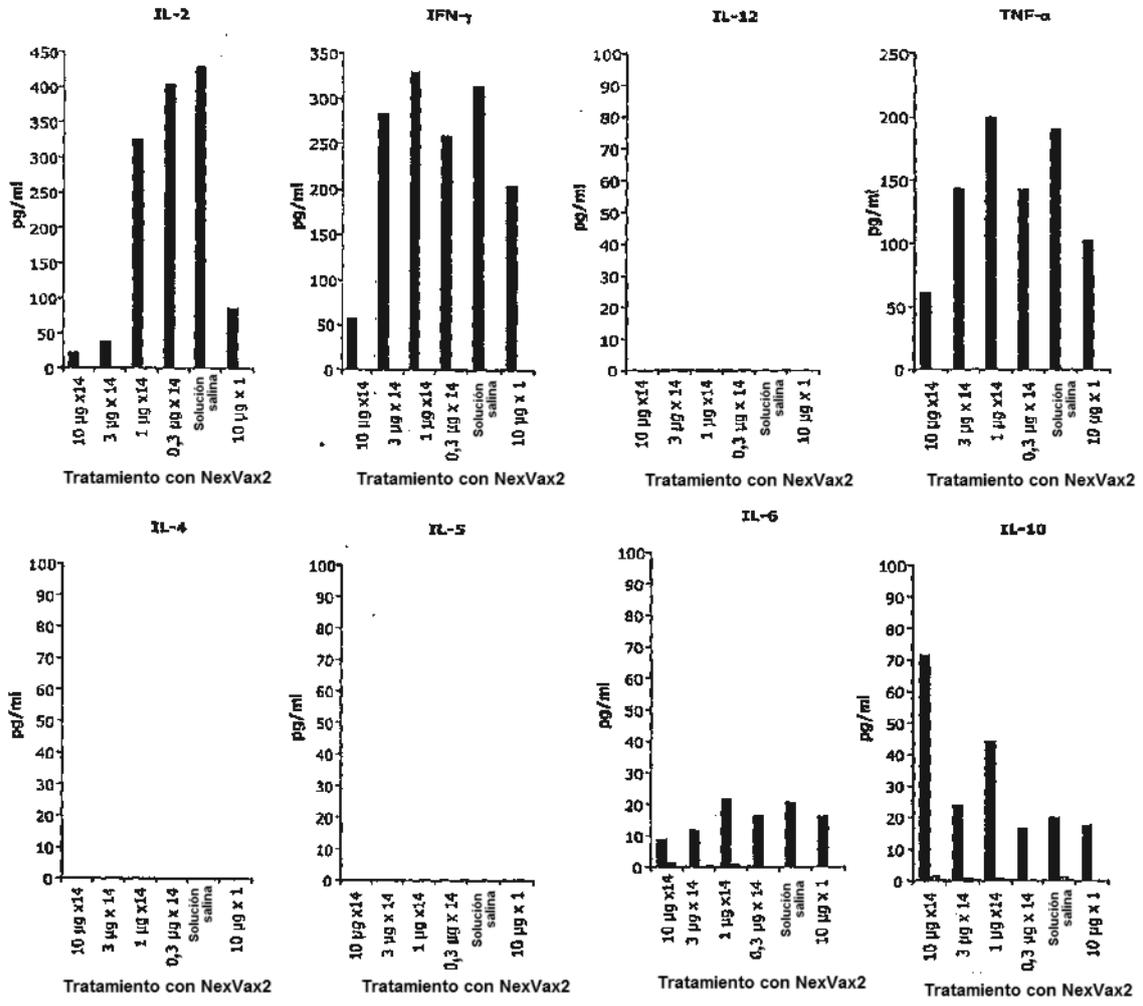


Figura 16

Día	Tiempo (notación de 24 horas)	Administración de tratamiento	Comidas y líquidos + exposición de gluten	Muestra de ELISpot/ Bioplex	Muestra de anticuerpo de suero	Muestra de sangre PK (10 ml)	Signos vitales	EKG	Tiempo (con respecto a la dosificación)	
1	0700	Administrar dosis		1	1		X	X	pre-dosis (60 minutos)	
	0800								0 minutos	
	1200									4 horas
6	0800		Almuerzo#	2			X	X	24 horas	
8	0700	Administrar dosis					X	X	pre-dosis (60 minutos)	
	0800								0 minutos	
	1200				Almuerzo#					4 horas
15	0700	Administrar dosis		3			X	X	pre-dosis (60 minutos)	
	0800								0 minutos	
	0815									15 minutos
	0830									30 minutos
	0845									45 minutos
	0900									1 hora
	0915									1,25 horas
	0930									1,5 horas
	1000									2 horas
1100							3 horas			

	1200		Almuerzo#	4	2		X	X	4 horas
20	0800 1200		Exposición a gluten Exposición a gluten				X	X	- -
21	0800 1200		Exposición a gluten Exposición a gluten				X	X	- -
22	0800 1200		Exposición a gluten Exposición a gluten				X	X	- -
25	0800			5			X	X	-

Comidas servidas 5-10 minutos después de la recogida de sangre
 Nota: Se dio de alta a los sujetos de la instalación clínica de 6 a 8 horas después de dosificar con NexVax2. Se analizaron ECG por triplicado a un intervalo de aproximadamente 1 minuto

Figura 17