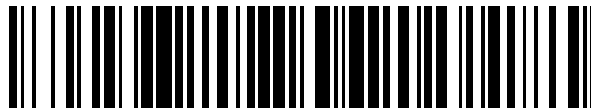


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 792**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2005 PCT/GB2005/001621**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2005 WO05105129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2005 E 05738143 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 1755639**

54 Título: **Epítomos relacionados con la enfermedad celiaca**

30 Prioridad:

28.04.2004 AU 2004201774

11.02.2005 AU 2005900650

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

08.01.2018

73 Titular/es:

BTG INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)

5 Fleet Place

London EC4M 7RD, GB

72 Inventor/es:

ANDERSON, ROBERT;

BEISSBATH, TIM y

DIN, JASON TYE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 648 792 T3

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

DESCRIPCIÓN

Epítomos relacionados con la enfermedad celiaca

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

La enfermedad celiaca está causada por una hipersensibilidad mediada por el sistema inmunitario a gluten dietético. Las proteínas del gluten en trigo, centono, cebada y en algunos casos avena son tóxicas en la enfermedad celiaca. El gluten está compuesto de gliadinas alfa/beta, gamma y omega, y gluteninas de bajo y alto peso molecular (BPM y APM) en trigo, hordeínas en cebada, secalinas en centeno y aveninas en avena. Las hordeínas y secalinas son homólogas a gliadinas gamma y omega y gluteninas de bajo y alto peso molecular en trigo. Las aveninas son filogenéticamente más distantes que las hordeínas y secalinas del gluten de trigo.

- 15 El objetivo de la investigación en la enfermedad celiaca ha sido definir los componentes tóxicos del gluten definiendo los péptidos que estimulan los linfocitos T específicos a gluten. La definición precisa de epítomos de gluten permite el desarrollo de nuevas diagnosis, terapéutica, ensayos para la contaminación por gluten en comida y granos no tóxicos que retienen las cualidades del cocinado/horneado del gluten tradicional. Muchas de estas aplicaciones requieren un completo entendimiento de todos en vez de los péptidos tóxicos más comunes en gluten.

- 20 Los genes codificadores de HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 están presentes en más del 99 % de los individuos con enfermedad celiaca en comparación con aproximadamente el 35 % de la población Caucásica general. Los péptidos derivados de gluten (epítomos) unidos a HLA-DQ2 o HLA-DQ8 estimulan los linfocitos T específicos. Los epítomos restringidos a HLA-DQ2 y DQ8 incluyen una secuencia de 9 aminoácidos "núcleo" que interactúa directamente con la ranura de unión peptídica de HLA-DQ2 o DQ8 y con receptores de linfocito T afines. En general, bibliotecas de péptidos de solapamiento (normalmente 15 a 20meros) que contienen todos los péptidos 10 o 20mero únicos en un antígeno se han usado para mapear epítomos de linfocitos T restringidos a HLA de clase II.

- 30 Se sabe que una serie de péptidos de gluten activan los linfocitos T específicos a gluten en enfermedad celiaca. Estudios previos han identificado péptidos de gluten de proteínas de gluten seleccionadas o productos de digestión del gluten. Los clones y las líneas de linfocito T aislados de biopsias intestinales se han usado para investigar estos componentes de gluten.

- 35 La modificación del gluten por la enzima, transglutaminasa de tejido (tTG) presente en el tejido intestinal, incrementa sustancialmente la capacidad estimuladora del gluten sobre los linfocitos T específicos a gluten. La mayoría de los epítomos conocidos para los linfocitos T específicos a gluten corresponden a péptidos de gluten desamidados por tTG. La transglutaminasa media la desamidación de residuos de glutamina específicos (a glutamato) en gluten. Secuencias que contienen glutamina susceptibles a desamidación por tTG se ajustan generalmente a un motivo: QXPX o QXX (FYMLVW) (véase Vader W. y col. 2002 *J. Exp. Med.* 195:643-649, PCT WO 03/066079, y Fleckenstein B. 2002. *J. Biol. Chem.* 277:34109-16). El motivo para péptidos que se unen a HLA-DQ2 y que son susceptibles a desamidación por tTG se ha usado para predecir ciertos epítomos de gluten (Vader y col. *J. Exp. Med.* 2002 *J. Exp. Med.* 195:643-649, PCT WO 03/066079).

- 45 Sin embargo, otros grupos han identificado epítomos para clones de linfocito T intestinal específico a gluten y líneas que usan paneles de once gliadinas alfa/beta recombinantes (11) y cinco gamma (Arentz-Hansen H. 2000. *J. Exp. Med.* 191:603-612, Arentz-Hansen H. 2002. *Gastroenterology* 123:803-809, PCT WO 02/083722), y lisados de proteínas de gluten purificadas (Sjostrom H. y col. 1998. *Scand. J. Immunol.* 48,111-115; van de Wal, Y. y col. 1998. *J. Immunol.* 161(4):1.585-1.588; van de Wal, Y. y col. 1999. *Eur. J. Immunol.* 29:3.133-3.139; Vader W. y col. 2002. *Gastroenterology* 122:1.729-1.737.).

- 50 Nuestro trabajo ha aprovechado la observación de que la exposición a gluten *in vivo* induce linfocitos T específicos a gluten CD4+ restringidos a HLA-DQ2 en sangre periférica expresando una integrina localizada en el intestino (alfa4beta7). Esta técnica permitió el mapeado del epítomo dominante en A-gliadina (57-73 QE65) (Anderson, RP y col. 2000. *Nat. Med.* 6:337-342., documento WO 01/25793). A-gliadina 57-73 QE65 corresponde a dos epítomos de solapamiento identificados usando clones de linfocito T intestinal (Arentz-Hansen H. y col. 2000. *J. Exp. Med.* 191:603-612, Arentz-Hansen H. y col. 2002. *Gastroenterology* 123:803-809). La ventaja de la exposición a gluten *in vivo* para inducir linfocitos T específicos a gluten es que se puede consumir cualquier comida y los linfocitos T resultantes inducidos en sangre (cuantificados en sangre periférica usando un ensayo simple ELISPOT de interferón gamma durante la noche) se habrán estimulado *in vivo* por epítomos presentados endógenamente, en vez de preparados *in vitro* por un antígeno sintético o purificado. Los ensayos durante la noche de linfocitos T de sangre periférica policlonales frescos también evitan el potencial para artefactos asociados con la purificación prolongada de clones de linfocito T.

- 65 Interesantemente, los clones y las líneas de linfocito T específicos para varios epítomos de gliadina gamma (Arentz-Hansen H. 2002. *Gastroenterology* 123:803-809, PCT WO 02/083722) reaccionan de manera cruzada con el epítomo de A-gliadina originalmente definido 57-73 QE65.

Aunque hay considerable homología dentro de las gliadinas alfa/beta, el trabajo anterior (véase el documento WO 03/104273) ha mostrado que el epítipo dominante reconocido en la enfermedad celiaca asociada a HLA-DQ2, "A-gliadina 57-73 QE65", es codificado por una minoría de las gliadinas alfa/beta presentes en Genbank.

5 Compendio de la invención

El estudio actual se presentó para desarrollar un método que permitirá el mapeado de todos los epítipos de linfocito T en gluten. El consumo de pan de trigo (200 g diario durante 3 días) o avena (100 g diariamente durante 3 días) se usó para inducir linfocitos T específicos a gluten o avenina en sangre periférica (recogida 6 días después de comenzar la exposición). Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se evaluaron en ensayos ELISPOT de interferón gamma durante la noche usando una biblioteca de péptidos de gluten y avenina que incluyen todas las secuencias de 12mero único incluidas en cada entrada de Genbank para gluten de trigo y/o aveninas de avena. Este objetivo se alcanzó estableciendo un algoritmo para diseñar péptidos que abarcan todos los epítipos potenciales en proteínas de gluten en Genbank (2922 20meros incluían todos los 14 epítipos de linfocito T potenciales de 964 9meros únicos), adaptando el ensayo ELISPOT de interferón gamma a un ensayo de alto rendimiento capaz de investigar más de 1.000 péptidos con sangre de un único individuo y desarrollar herramientas bioinformáticas para analizar e interpretar los datos generados.

Se identificó una serie de 41 "superfamilias" de péptidos de gluten de trigo como epítipos de linfocito T putativos. Las superfamilias compartían motivos en los que se permitió un nivel limitado de redundancia. Muchas de las familias más potentes incluyen epítipos de linfocito T conocidos que incluyen el epítipo dominante previamente descrito, A-gliadina 57-73.

A través de mapeado completo de epítipos de gluten usando CMSP después de exposición a gluten, los inventores han encontrado una serie de novedosos epítipos de gliadina, glutenina BPM y APM, y avenina para la enfermedad celiaca asociada a HLA-DQ2 y HLA-DQ8. Se identificaron novedosos epítipos para la enfermedad celiaca asociada a HLA-DQ2 y HLA-DQ8. La enfermedad celiaca asociada a HLA-DQ2 y HLA-DQ8 son genéticamente y funcionalmente distintas en términos del intervalo de epítipos de linfocito T que se reconocen. Además, tres péptidos presentes en proteínas de avenina de avena también activaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) después de la exposición a avena en sujetos celiacos HLA-DQ2+, la primera vez que se han identificado epítipos de avena. La identificación de péptidos de avenina reconocidos por linfocitos T después de la exposición a avena *in vivo* proporciona una base molecular para la recaída ocasional observada de celiacos después de la exposición a avena (Lundin KEA y col. 2003 *Gut* 52:1.649-52) y puede proporcionar una base para un diagnóstico predictivo o destoxificación genética de avena.

Los datos presentados en el presente documento proporcionarán una base completa para la definición de epítipos de linfocito T tanto "dominantes" comunes como "débiles" ocasionales en enfermedad celiaca. Esta información es la plataforma para aplicaciones funcionales tales como diagnosis, ensayos de alimentos, inmunoterapia y profilaxis, y para el diseño de proteínas de gluten no tóxicas útiles en granos modificados.

En particular, a través del mapeado completo de epítipos de linfocito T de gluten, los inventores han encontrado epítipos bioactivos en la enfermedad celiaca en pacientes HLA-DQ2+ en gliadinas y gluteninas de trigo, que tienen secuencias núcleo similares (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-199) y secuencias ampliadas similares (por ejemplo, SEQ ID NO: 200-1554, 1555-1655, 1656-1671 y 1830-1903). Los inventores también han encontrado epítipos bioactivos en la enfermedad celiaca en pacientes HLA-DQ2+ en: aveninas de avena que tienen secuencias núcleo similares (por ejemplo, SEQ ID NO: 1684-1695) y secuencias ampliadas similares (por ejemplo, SEQ ID NO: 1672-1683, 1696-1698 y 1764-1768); secalinas de centeno (SEQ ID NO: 1769-1786); y hordeinas de cebada (SEQ ID NO: 1787-1829). Además, se han identificado epítipos bioactivos en la enfermedad celiaca en pacientes HLA-DQ8+ en gliadinas de trigo que tienen secuencias núcleo similares (por ejemplo, SEQ ID NO: 1699-1721) y secuencias ampliadas similares (por ejemplo, SEQ ID NO: 1722-1763 y 1908-1927). Este mapeado completo proporciona así epítipos dominantes reconocidos por linfocitos T en pacientes celiacos. Por tanto, los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar usando cualquiera de estos epítipos identificados, y análogos y equivalentes de los mismos. Además, se ha demostrado que combinaciones de epítipos, es decir, "combitopos" o péptidos sencillos que comprenden dos o más epítipos, inducen respuestas equivalentes a los epítipos individuales, indicando que varios epítipos se pueden utilizar para usos terapéuticos, diagnósticos y otros de la invención. Tales combitopos pueden estar en forma de, por ejemplo, SEQ ID NO: 1906.

Agentes descritos en el presente documento incluyen uno o más de los epítipos que tienen las secuencias enumeradas en SEQ ID NO: 1578-1579, 1582-1583, 1587-1593, 1600-1620, 1623-1655, 1656-1671, 1672-1698, 1699-1763, 1764-1768, 1769-1786, 1787-1829, 1895-1903, 1906 y 1908-1927 y análogos y equivalentes de los mismos como se define en el presente documento.

Específicamente, la presente invención proporciona:

[1]. Un agente seleccionado de:

- (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
- (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud;

5 [2]. Una composición farmacéutica que comprende un agente según [1] y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

[3]. Una composición para su uso en un método de prevención o tratamiento de la enfermedad celiaca que comprende al menos un agente seleccionado de:

- 10
- (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
 - (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud;

15 [4]. Un agente seleccionado de:

- (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200;
- (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud; y
- (c) un análogo de (a) que es un péptido aislado que se une a anticuerpo, dicho anticuerpo se une a un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200;

20 para su uso en un método de tratamiento o prevención de la enfermedad celiaca en un individuo mediante inducción de inmunotolerancia del individuo para prevenir la producción de tal anticuerpo;

25 [5]. Un método de diagnóstico de la enfermedad celiaca, o susceptibilidad a enfermedad celiaca, en un individuo que comprende:

30 (a) poner en contacto una muestra del hospedador, *in vitro*, con al menos un agente seleccionado de:

- (i) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
- (ii) un análogo de (i) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce (i) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud; y

35 (b) determinar *in vitro* si los linfocitos T en la muestra reconocen el agente; indicando el reconocimiento por los linfocitos T que el individuo tiene, o es susceptible a, enfermedad celiaca;

[6]. Una composición, para su uso en un método de diagnóstico de la enfermedad celiaca, o susceptibilidad a enfermedad celiaca, en un individuo que comprende un agente seleccionado de

- 40
- (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
 - (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud,

45 comprendiendo dicho método la determinación de si los linfocitos T del individuo reconocen el agente, indicando el reconocimiento por los linfocitos T que el individuo tiene, o es susceptible a, enfermedad celiaca;

[7]. Un método para identificar un análogo de un péptido que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200 comprendiendo dicho método determinar, *in vitro*, si un péptido candidato es reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200, indicando el reconocimiento del péptido candidato que el péptido candidato es un análogo, siendo dicho análogo de no más de 50 aminoácidos de longitud;

50

55 [8]. Un método de diagnóstico de la enfermedad celiaca, o susceptibilidad a enfermedad celiaca, en un individuo que comprende determinar, *in vitro*, la presencia de un anticuerpo que se une a un epítipo de una secuencia peptídica seleccionada de:

- (i) un péptido que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
- (ii) un análogo peptídico de (i) que es capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce (i) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud,

60 en una muestra del individuo, indicando la presencia del anticuerpo que el individuo tiene, o es susceptible a, enfermedad celiaca;

65 [9]. Un método *in vitro* de determinación de si una composición es capaz de causar enfermedad celiaca que comprende determinar si una secuencia proteica capaz de ser modificada por una transglutaminasa a un péptido

que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200 está presente en la composición, indicando la presencia de la secuencia de oligopéptido que la composición es capaz de causar enfermedad celiaca;

5 [10]. Un kit para llevar a cabo un método según [5] que comprende un agente seleccionado de

- (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
- (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud,

10 y un medio para detectar el reconocimiento del péptido por el linfocito T; y

[11]. Un anticuerpo o fragmento del mismo, específico para SEQ ID NO: 200.

15 El término "proteína de gluten" abarca gliadinas alfa/beta, gamma y omega, y gluteninas de alto y bajo peso molecular (BPM y APM) en trigo, hordeínas en cebada, secalinas en centeno, y aveninas en avenas. La invención se trata particularmente de gliadinas y aveninas.

20 El agente se puede usar para la preparación de un medio diagnóstico para su uso en un método de diagnosis de enfermedad celiaca, o susceptibilidad a enfermedad celiaca, en un individuo, comprendiendo dicho método determinar si los linfocitos T del individuo reconocen el agente, indicando el reconocimiento por los linfocitos T que el individuo tiene, o es susceptible a, enfermedad celiaca.

25 El descubrimiento de epítopos que se modifican por transglutaminasa también permite el diagnóstico de la enfermedad celiaca basándose en la determinación de si están presentes otros tipos de respuesta inmunitaria a estos epítopos.

Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 muestra un método para generar todos los posibles epítopos peptídicos de un grupo de proteínas.

La Figura 2 muestra los números de acceso de Genbank para productos génicos de gluten presentes en la base de datos Genbank el 16 de junio de 2003.

35 La Figura 3A muestra un algoritmo de expectación-maximización (EM) para analizar los datos de ELISPOT. La Figura 3B muestra un ensayo sobre un conjunto de datos de pacientes con enfermedad celiaca.

La Figura 4 muestra un procedimiento iterativo para encontrar el conjunto mínimo de epítopos que responden.

40 La Figura 5 muestra secuencias de gliadina y glutenina (SEQ ID NO: 1-1554). En la columna "consenso", las letras minúsculas usan el código estándar de aminoácidos de una letra, pero las letras mayúsculas tienen un significado diferente: E=["e" o "q"], F=["f" o "y" o "w"], I=["i" o "l" o "v"], S=["s" o "t"], R=["r" o "k" o "h"]. La columna "secuencia" usa el código estándar de aminoácidos de una letra.

45 La Figura 6 muestra péptidos de gluten que estimulan el interferón gamma en CMSP recogida 6 días después de exposición a gluten en voluntarios con enfermedad celiaca HLA-DQ2+ (SEQ ID NO: 1555-1655). Los 9meros indicados son comunes a 200 grupos de péptidos 20mer bioactivos "estructuralmente" relacionados. Las secuencias de gluten se clasifican según la proporción X de bioactividad de sujetos que responden.

50 La Figura 7 muestra los resultados de un experimento de exposición a trigo (SEQ ID NO: 1656-1671). Estos péptidos dan respuestas de alta calidad (indicadas "Y") en diez sujetos (A-J) después de exposición a trigo.

55 La Figura 8 muestra péptidos de Avenina (+/- desamidación por tTG) que estimulan interferón- γ en CMSP recogida 6 días después de exposición a gluten en voluntarios con enfermedad celiaca HLA-DQ2+ (SEQ ID NO: 1672-1698). Aquellos marcados con un * son 20meros únicos óptimos que inducen IFN- γ después de la exposición a avena.

60 La Figura 9 muestra los 40 20meros más potentes (SEQ ID NO: 1699-1763) en dos sujetos HLA-DQ8 (no HLA-DQ2) agrupados según las secuencias núcleo compartidas. La secuencia núcleo del grupo 6 (QGSFQPSQQ) corresponde al epítipo de gliadina alfa descrito por van de Wal y col. (*J. Immunol.* 1998, 161(4):1.585-1.588). La respuesta máxima en el Sujeto A era de 271 SFC (solo medio, no respuesta de péptido: 4 SFC), y en B era de 26 SFC (solo medio, no respuesta de péptido: 1 SFC).

65 La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de A-gliadina (SEQ ID NO: 1928) basándose en la secuenciación de aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

El término "enfermedad celiaca" abarca un espectro de afecciones causadas por grados variantes de sensibilidad al gluten, incluyendo una forma grave caracterizada por una mucosa de intestino delgado lisa (atrofia vellosa hiperplásica) y otras formas caracterizadas por síntomas más suaves.

El individuo anteriormente mencionado (en el contexto de diagnóstico o terapia) es humano. Pueden tener enfermedad celiaca (sintomática o asintomática) o se supone que la tienen. Pueden estar en una dieta libre de gluten. Pueden estar en una respuesta de fase aguda (por ejemplo, pueden tener enfermedad celiaca, pero solamente han ingerido gluten en las últimas 24 horas antes de lo cual habían estado en una dieta libre de gluten durante 14 a 28 días).

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

El agente

El agente es un péptido, por ejemplo, de 7 a 50 aminoácidos de longitud, tal como 10 a 40, 12 a 35 o 15 a 30 aminoácidos de longitud.

El agente puede ser el péptido representado por SEQ ID NO: 200 o un epítipo que comprende la secuencia que comprende SEQ ID NO: 200 que es un oligopéptido aislado derivado de una proteína de gluten; o un equivalente de estas secuencias de una proteína de gluten de origen natural.

Por tanto, el epítipo puede ser un derivado de una proteína de origen natural, particularmente de un gluten de trigo. Tal derivado generalmente es un fragmento de la proteína de gluten, o un derivado mutado de la proteína completa o fragmento. Por lo tanto, el epítipo de la invención no incluye la proteína de gluten completa de origen natural, y no incluye otras proteínas de gluten de origen natural completas.

Generalmente tales fragmentos serán al menos 7 aminoácidos de longitud (por ejemplo, al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud).

Generalmente tales fragmentos serán reconocidos por linfocitos T a al menos en la misma medida en que los agentes de los cuales se derivan son reconocidos en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento usando muestras de pacientes con enfermedad celiaca.

El agente puede ser el péptido representado por SEQ ID NO: 200 o una proteína que comprende una secuencia que corresponde a SEQ ID NO: 200 (tal como fragmentos de una proteína de gluten que comprende SEQ ID NO: 200, por ejemplo, después de que la proteína de gluten se haya tratado con transglutaminasa). Los fragmentos bioactivos de tales secuencias son también agentes de la invención. Generalmente tales fragmentos serán al menos de 7 aminoácidos de longitud (por ejemplo, al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud). Análogos de estas secuencias, como se definen en el presente documento, también son agentes de la invención.

En el caso en el que el epítipo comprende una secuencia equivalente a los epítipos anteriores (incluyendo fragmentos) de otra proteína de gluten (por ejemplo, cualquiera de las proteínas de gluten anteriormente mencionadas en el presente documento o cualquier proteína de gluten que causa enfermedad celiaca), tales secuencias equivalentes corresponderán a un fragmento de una proteína de gluten generalmente tratada (parcialmente o completamente) con transglutaminasa. Tales péptidos equivalentes se pueden determinar alineando las secuencias de otras proteínas de gluten con la proteína de gluten de la cual deriva el epítipo original (por ejemplo, usando cualquiera de los programas mencionados en el presente documento). La transglutaminasa está comercialmente disponible (por ejemplo, Sigma T-5398).

El agente que es un análogo es capaz de ser reconocido por un RLT que reconoce (i). Por lo tanto, generalmente cuando se añade el análogo a los linfocitos T en presencia de (i), generalmente también en presencia de una célula presentadora de antígeno (CPA) (tal como cualquiera de las CPA mencionadas en el presente documento), el análogo inhibe el reconocimiento de (i), es decir, el análogo es capaz de competir con (i) en tal sistema.

El análogo puede ser uno que es capaz de unirse al RLT que reconoce (i). Tal unión se puede ensayar mediante técnicas estándar. Tales RLT se pueden aislar de los linfocitos T que se ha demostrado que reconocen (i) (por ejemplo, usando el método de la invención). La demostración de la unión del análogo a los RLT, a continuación, se puede demostrar determinando si los RLT inhiben la unión del análogo a una sustancia que une el análogo, por ejemplo, un anticuerpo al análogo. Generalmente el análogo se une a una molécula MHC de clase II (por ejemplo, HLA-DQ2) en tal inhibición del ensayo de unión.

65

Generalmente el análogo inhibe la unión de (i) a un RLT. En este caso se disminuye la cantidad de (i) que se une al RLT en presencia del análogo. Esto es porque el análogo es capaz de unirse al RLT y, por lo tanto, compite con (i) para unirse al RLT.

5 Los linfocitos T para su uso en los anteriores experimentos de unión se pueden aislar de pacientes con enfermedad celiaca, por ejemplo, con la ayuda del método de la invención. Otras características de unión del análogo también pueden ser las mismas que (i), y, por tanto, generalmente el análogo se une a la misma molécula MHC de clase II a la cual se une el péptido (HLA-DQ2 o -DQ8). Generalmente el análogo se une a los anticuerpos específicos para (i) y, por tanto, inhibe la unión de (i) a tales anticuerpos.

10 El análogo es un péptido. Puede tener homología con (i), generalmente al menos 70 % de homología, preferiblemente al menos 80, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % de homología con (i), por ejemplo, sobre una región de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más (tal como la longitud entera del análogo y/o (i), o a través de la región que contacta con el RLT o se une a la molécula MHC) aminoácidos contiguos. En la técnica se conocen métodos de medición de homología de proteína y se entenderá por los expertos en la técnica que en el presente contexto, la homología se calcula sobre la base de la identidad del aminoácido (a veces referido como "homología dura").

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

25 El programa para la realización de los análisis BLAST está públicamente disponible a través del "National Center for Biotechnology Information" en Internet en, por ejemplo, "www.ncbi.nlm.nih.gov". Este algoritmo implica identificar primero el par de secuencia de alta puntuación (HPS) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia cuestionada que o bien empareja o satisface alguna puntuación umbral valorada T como positiva cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabra de alrededor (Altschul y col., supra). Estas correspondencias de palabra de alrededor iniciales actúan como semillas para la iniciación de búsquedas para encontrar HSP que las contienen. Las correspondencias de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de alineamiento acumulativo se pueda incrementar. Las extensiones para las correspondencias de palabra en cada dirección se paran cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo disminuye en la cantidad X de su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuo de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la rapidez del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10.915-10.919) alineamientos (B) de 50, expectación (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

40 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5.873-5.787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), lo cual proporciona un indicio de la probabilidad por la cual un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurrirían por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menos de aproximadamente 1, preferiblemente menos de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

50 Los análogos peptídicos homólogos generalmente difieren de (i) por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más mutaciones (las cuales pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones). Estas mutaciones se pueden medir a través de cualquiera de las regiones anteriormente mencionadas en relación con el cálculo de homología. Las sustituciones preferiblemente son "conservadoras". Estas se definen según la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir uno por otro:

55

ALIFÁTICO	No polar	GAP
		ILV
	Polar- no cargado	CSTM
Polar – cargado	NQ	
	DE	
AROMÁTICO		KR
		HFY

Generalmente, los aminoácidos en el análogo en las posiciones equivalentes a aminoácidos en (i) que contribuyen a la unión de la molécula MHC o que son responsables del reconocimiento por el RLT, son los mismos o conservados.

5 Generalmente el péptido análogo comprende una o más modificaciones, las cuales pueden ser modificaciones post-traducción naturales o modificaciones artificiales. La modificación puede proporcionar un resto químico (generalmente por sustitución de un hidrógeno, por ejemplo, un enlace C-H), tal como un grupo amino, acetilo, hidroxilo o halógeno (por ejemplo, flúor) o grupo carbohidrato. Generalmente la modificación está presente en el terminal N o C.

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

15 Generalmente el análogo tiene una forma, tamaño, flexibilidad o configuración electrónica que es básicamente similar a (i), Generalmente es un derivado de (i).

20 En una realización el agente se une a una molécula MHC de clase II (o un fragmento de la misma capaz de unirse al agente). 2, 3, 4 o más de tales complejos pueden estar asociados o unidos uno a otro, por ejemplo, usando un sistema basado en biotina/estreptavidina, en el cual generalmente 2, 3 o 4 moléculas MHC marcadas con biotina se unen a un resto de estreptavidina. Este agente unido generalmente inhibe la unión del complejo (i)/MHC de clase II a un RLT o anticuerpo que es específico para el complejo.

25 El análogo generalmente se diseña por medios computacionales y, a continuación, se sintetiza usando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente el análogo se puede seleccionar de una biblioteca de compuestos. La biblioteca puede ser una biblioteca combinatoria o una biblioteca de expresión, tal como una biblioteca de expresión en fagos. La biblioteca de compuestos puede estar expresada en la biblioteca de expresión en la forma de estar unida a una molécula MHC de clase II, tal como HLA-DQ2 o -DQ8. Los análogos generalmente se seleccionan de la biblioteca basándose en su capacidad de imitar las características de unión (i). Por tanto, se pueden seleccionar basándose en la capacidad de unión a un RLT o anticuerpo que reconoce (i).

30 Generalmente los análogos serán reconocidos por linfocitos T a al menos en la misma medida que cualquiera de los agentes (i), por ejemplo, al menos en la misma medida que el epítipo equivalente es reconocido en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento, generalmente usando linfocitos T de pacientes con enfermedad celíaca. Los análogos se pueden reconocer a esta medida *in vivo* y, por tanto, pueden ser capaces de inducir síntomas de enfermedad celíaca a al menos en la misma medida que cualquiera de los agentes mencionados en el presente documento (por ejemplo, en un paciente humano o modelo animal).

35 Los análogos se pueden identificar en un método que comprende determinar si una sustancia candidata es reconocida por un receptor de linfocito T que reconoce un epítipo de la invención, indicando el reconocimiento de la sustancia que la sustancia es un análogo. Tales RLT pueden ser cualquiera de los RLT mencionados en el presente documento, y pueden estar presentes sobre los linfocitos T. Cualquier ensayo adecuado mencionado en el presente documento se puede usar para identificar el análogo. En una realización este método se lleva a cabo *in vivo*. Como se ha mencionado anteriormente los análogos preferidos se reconocen a al menos en la misma medida que el epítipo equivalente, y así el método se puede usar para identificar análogos que se reconocen en esta medida.

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

50 El agente puede ser un producto que comprende al menos 2, 5, 10 o 20 agentes definidos por (i) o (ii). Generalmente la composición comprende epítipos de la invención (o análogos equivalentes) de diferentes proteínas de gluten, tales como cualquiera de las especies o variedades de o tipos de proteína de gluten mencionadas en el presente documento. Composiciones preferidas comprenden al menos un epítipo de la invención, o análogo equivalente, de todos los glútenes presentes en cualquiera de las especies o variedades mencionadas en el presente documento, o de 2, 3, 4 o más de las especies mencionadas en el presente documento (tales como del panel de especies que consisten en trigo, centeno, cebada, avena y triticale). Por tanto, el agente puede ser monovalente o multivalente.

60 Según ciertas realizaciones de la invención, el agente no tiene o no está basado en una secuencia descrita en los documentos WO 02/083722 y/o WO 01/25793 y/o W003/104273 y/o enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1555-1577, 1580-1581, 1584-1586, 1594-1599, 1621-1622 y/o no es un agente derivado de A-gliadina, cuya secuencia es dada en la Figura 10.

Diagnóstico

Como se mencionó anteriormente el método de diagnóstico de la invención se puede basar en la detección de los linfocitos T que se unen al agente o en la detección de anticuerpos que reconocen el agente.

5 Los linfocitos T que reconocen el agente en el método (que incluyen el uso anteriormente mencionado) generalmente son linfocitos T que se han sensibilizado previamente *in vivo* a una o más proteínas de gluten. Como se mencionó anteriormente se ha encontrado que tales linfocitos T experimentados con antígeno están presentes en la sangre periférica.

10 En el método los linfocitos T se pueden poner en contacto con el agente *in vitro* o *in vivo*, y determinar si el reconocimiento de los linfocitos T del agente se puede realizar *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, la invención proporciona el agente para su uso en un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano. Se proporcionan diferentes agentes para uso simultáneo, separado o secuencial en tal método.

15 El método *in vitro* generalmente se lleva a cabo en solución acuosa en la que se añade el agente. La solución también comprenderá los linfocitos T (y en ciertas realizaciones las CPA discutidas más adelante). El término "poner en contacto" usado en el presente documento incluye añadir la sustancia particular a la solución.

20 La determinación de si los linfocitos T reconocen el agente generalmente se consigue detectando un cambio en el estado de los linfocitos T en presencia del agente o determinando si los linfocitos T se unen al agente. El cambio en el estado generalmente está causado por actividad funcional específica a antígeno del linfocito T después de que RLT se una al agente. El cambio de estado se puede medir dentro (por ejemplo, cambio en la expresión intracelular de proteínas) o fuera (por ejemplo, detección de sustancias secretadas) de los linfocitos T.

25 El cambio en el estado del linfocito T puede ser el comienzo de o el incremento en la secreción de una sustancia del linfocito T tal como citoquina, especialmente IFN- γ , IL-2 o TNF- α . La determinación de la secreción de IFN- γ es particularmente preferida. La sustancia generalmente se puede detectar dejando que se una a un agente de unión específico y, a continuación, midiendo la presencia del complejo agente de unión específico/sustancia. El agente de unión específico generalmente es un anticuerpo, tal como anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos a citoquinas están comercialmente disponibles, o se pueden producir usando técnicas estándares.

30 Generalmente el agente de unión específico se inmoviliza sobre un soporte sólido. Después de que se permita que la sustancia se una al soporte sólido opcionalmente se puede lavar para separar el material que no se une específicamente al agente. El complejo agente/sustancia se puede detectar usando un segundo agente de unión que se unirá al complejo. Generalmente el segundo agente se une a la sustancia en un sitio que es diferente del sitio al que se une el primer agente. El segundo agente preferiblemente es un anticuerpo y está marcado directa o indirectamente por un marcador detectable.

40 Por tanto, el segundo agente puede ser detectado por un tercer agente que generalmente está marcado directa o indirectamente por un marcador detectable. Por ejemplo, el segundo agente puede comprender un resto de biotina, permitiendo la detección por un tercer agente que comprende un resto de estreptavidina y generalmente fosfatasa alcalina como marcador detectable.

45 En una realización el sistema de detección que se usa es el ensayo ELISPOT *ex vivo* descrito en el documento WO 98/23960. En ese ensayo IFN- γ secretado del linfocito T está unido por un primer anticuerpo específico a IFN- γ que está inmovilizado sobre un soporte sólido. A continuación, se detecta el IFN- γ unido usando un segundo anticuerpo específico a IFN- γ que está marcado con un marcador detectable. Tal anticuerpo marcado se puede obtener de MABTECH (Estocolmo, Suecia). Otros marcadores detectables que se pueden usar se describen más adelante.

50 El cambio en el estado del linfocito T que se puede medir puede ser el incremento en la absorción de sustancias por el linfocito T, tal como la absorción de timidina. El cambio en el estado puede ser un incremento en el tamaño de los linfocitos T, o la proliferación de los linfocitos T, o un cambio en los marcadores de superficie celular sobre el linfocito T.

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

60 En una realización cuando se une al RLT el agente se une a una molécula MHC de clase II (generalmente HLA-DQ2 o -DQ8), que generalmente está presente sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno (CPA). Sin embargo, como se menciona en el presente documento, otros agentes pueden unirse a un RLT sin la necesidad de unirse también a una molécula MHC.

65

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

10 El procesamiento puede comprender separación de componentes de la muestra. Generalmente se separan células mononucleares (CM) de las muestras. Las CM comprenderán los linfocitos T y CPA. Por tanto, en el método las CPA presentes en las CM separadas pueden presentar el péptido a los linfocitos T. En otra realización solamente los linfocitos T, tales como solamente los linfocitos T CD4, se pueden purificar de la muestra. CMSP, CM y linfocitos T se pueden separar de la muestra usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Lalvani y col (1997) *J. Exp. Med.* 186, p859-865.

15 En una realización, los linfocitos T usados en el ensayo están en forma de muestras no procesadas o diluidas, o son linfocitos T recién aislados (tal como en forma de CM o CMSP recién aisladas) que se usan directamente *ex vivo*, es decir, no se cultivan antes de ser usados en el método. Por tanto, los linfocitos T no se han vuelto a estimular de una manera específica a antígeno *in vitro*. Sin embargo, los linfocitos T se pueden cultivar antes de su uso, por ejemplo, en presencia de uno o más de los agentes, y generalmente también citoquinas que promueven el crecimiento exógeno. Durante el cultivo el(los) agente(s) generalmente está(n) presente(s) sobre la superficie de CPA, tales como la CPA usada en el método. El precultivo de los linfocitos T puede conducir a un incremento en la sensibilidad del método. Por tanto, los linfocitos T se pueden convertir en línea celulares, tales como líneas celulares de corto plazo (por ejemplo, como se describe en Ota y col (1990) *Nature* 346, p183-187).

25 La CPA que generalmente está presente en el método puede ser del mismo individuo que el linfocito T o de un hospedador diferente. La CPA puede ser una CPA de origen natural o una CPA artificial. La CPA es una célula que es capaz de presentar el péptido a un linfocito T. Generalmente es un linfocito B, célula dendrítica o macrófago. Generalmente se separa de la misma muestra que el linfocito T y generalmente está purificada juntamente con el linfocito T. Por tanto, la CPA puede estar presente en CM o CMSP. La CPA generalmente es una célula *ex vivo* recién aislada o una célula cultivada. Puede estar en forma de una línea celular, tal como una línea celular a corto plazo o inmortalizada. La CPA puede expresar moléculas MHC de clase II vacías sobre su superficie.

30 En el método se pueden usar uno o más agentes (diferentes). Generalmente los linfocitos T derivados de la muestra se pueden colocar en un ensayo con todos los agentes que se pretende ensayar o los linfocitos T se pueden dividir y colocar en ensayos separados cada uno de los cuales contiene uno o más de los agentes.

35 La invención también proporciona los agentes tales como dos o más de cualquiera de los agentes mencionados en el presente documento (por ejemplo, las combinaciones de agentes que están presentes en el agente de composición discutido anteriormente) para separar simultáneamente o usar secuencialmente (por ejemplo, para su uso *in vivo*).

40 En una realización el agente por sí mismo se añade directamente a un ensayo que comprende linfocitos T y CPA. Como se discutió anteriormente los linfocitos T y CPA en tal ensayo podría estar en forma de CM. Cuando se usan agentes que pueden ser reconocidos por el linfocito T sin la necesidad de presentación por CPA, a continuación, no se requiere CPA. Los análogos que imitan el (i) original unido a una molécula MHC son un ejemplo de tal agente.

45 En una realización se suministra el agente a la CPA en ausencia del linfocito T. A continuación, se suministra la CPA al linfocito T, generalmente después de dejar que presente el agente sobre su superficie. El péptido se puede haber absorbido dentro de la CPA y presentado, o simplemente absorbido sobre la superficie sin entrar dentro de la CPA.

50 La duración durante la cual el agente está en contacto con los linfocitos T variará dependiendo del método usado para determinar el reconocimiento del péptido. Generalmente 10^5 a 10^7 , preferiblemente 5×10^5 a 10^6 CMSP se añaden a cada ensayo. En el caso en el que el agente se añade directamente al ensayo su concentración es de 10^{-1} a 10^3 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente 0,5 a 50 $\mu\text{g/ml}$ o 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

55 Generalmente la duración del tiempo durante el que se incuban los linfocitos T con el agente es de 4 a 24 horas, preferiblemente 6 a 16 horas. Cuando se usan CMSP *ex vivo* se ha encontrado que se pueden incubar $0,3 \times 10^6$ CMSP en 10 $\mu\text{g/ml}$ de péptido durante 12 horas a 37 °C.

60 La determinación del reconocimiento del agente por los linfocitos T se pueden hacer midiendo la unión del agente a los linfocitos T (esto se puede llevar a cabo usando cualquier formato de ensayo de unión adecuado discutido en el presente documento). Generalmente los linfocitos T que se unen al agente se pueden clasificar basándose en esta unión, por ejemplo, usando una máquina de FACS. La presencia de linfocitos T que reconocen el agente se considerará que se da si la frecuencia de células clasificadas usando el agente está por encima de un valor "control". La frecuencia de los linfocitos T experimentados con antígeno generalmente es de 1 de 10^6 a 1 de 10^3 , y por lo tanto se puede determinar si las células clasificadas son o no linfocitos T experimentados con antígeno.

65

La determinación del reconocimiento del agente por los linfocitos T se pueden medir *in vivo*. Generalmente el agente se administra al hospedador y, a continuación, se puede medir una respuesta que indica el reconocimiento del agente. El agente generalmente se administra intradérmicamente o epidérmicamente. El agente generalmente se administra poniéndolo en contacto con el exterior de la piel, y se puede retener en el sitio con la ayuda de un apósito o vendaje. Alternativamente, el agente se puede administrar con una aguja, tal como por inyección, pero también se puede administrar por otros métodos tales como balística (por ejemplo, las técnicas balísticas que se pueden usar para administrar ácidos nucleicos). El documento EP-A-0693119 describe técnicas que generalmente se pueden usar para administrar el agente. Generalmente, se administra de 0,001 a 1.000 µg, por ejemplo, de 0,01 a 100 µg o 0,1 a 10 µg de agente.

En una realización se puede administrar un producto que es capaz de proporcionar el agente *in vivo*. Por tanto, se puede administrar un polinucleótido capaz de expresar el agente, generalmente en cualquiera de los modos anteriormente descritos para la administración del agente. El polinucleótido generalmente tiene cualquiera de las características del polinucleótido proporcionado por la invención que se discute más adelante. El agente se expresa a partir del polinucleótido *in vivo*. Generalmente se administra de 0,001 a 1.000 µg, por ejemplo, de 0,01 a 100 µg o 0,1 a 10 µg de polinucleótido.

El reconocimiento del agente administrado a la piel generalmente está indicado por la ocurrencia de la inflamación (por ejemplo, induración, eritema o edema) en el sitio de administración. Esto generalmente se mide por examen visual del sitio.

El método de diagnóstico basado en la detección de un anticuerpo que une al agente generalmente se lleva a cabo poniendo en contacto una muestra del individuo (tal como cualquiera de las muestras mencionadas en el presente documento, opcionalmente procesadas de cualquier manera anteriormente mencionada) con el agente y determinando si un anticuerpo en la muestra une al agente, indicando tal unión que el individuo tiene, o es susceptible a enfermedad celiaca. Se puede usar cualquier formato adecuado de ensayo de unión, tal como cualquiera de tales formatos mencionados en el presente documento.

Terapia

La identificación del epítipo inmunodominante y otros epítipos descritos en el presente documento permite que se produzcan productos terapéuticos que guían los linfocitos T que reconocen este epítipo (siendo tales linfocitos T unos que participan en la respuesta inmunitaria frente a proteínas de gluten). Estos descubrimientos también permiten la prevención o el tratamiento de enfermedad celiaca por supresión (por inducción de inmunotolerancia (*tolerization*)) de un anticuerpo o respuesta de linfocito T a el(los) epítipo(s).

Ciertos agentes de la invención unen al RLT que reconoce el epítipo de la invención (medido usando cualquiera de los ensayos de unión anteriormente discutidos) y causan inducción de inmunotolerancia del linfocito T que lleva el RLT. Tales agentes, opcionalmente en asociación con un vehículo, por lo tanto, se pueden usar para prevenir o tratar enfermedad celiaca.

Generalmente la inducción de inmunotolerancia puede ser causada por los mismos péptidos que pueden (después de ser reconocidos por el RLT) causar actividad funcional específica a antígeno del linfocito T (tal como tal actividad mencionada en el presente documento, por ejemplo, secreción de citoquinas). Tales agentes causan inducción de inmunotolerancia cuando se presentan al sistema inmunitario en un contexto de "inducción de inmunotolerancia".

La inducción de inmunotolerancia conduce a una disminución en el reconocimiento de un linfocito T o epítipo de anticuerpo por el sistema inmunitario. En el caso de un epítipo de linfocito T esto puede ser causado por la deleción o anergización de los linfocitos T que reconocen el epítipo. Por tanto, se disminuye la actividad del linfocito T (por ejemplo, medida en ensayos adecuados mencionados en el presente documento) en respuesta al epítipo. La inducción de inmunotolerancia por una respuesta de anticuerpo significa que se produce una cantidad disminuida del anticuerpo específico al epítipo cuando se administra el epítipo.

Se conocen métodos de presentación de antígenos al sistema inmunitario en dicho contexto y se describen por ejemplo en Yoshida y col. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 82, 207-215 (1997), Thurau y col. *Clin. Exp. Immunol.* 109, 370-6 (1997), y Weiner y col. *Res. Immunol.* 148, 528-33 (1997). En particular ciertas vías de administración pueden causar inducción de inmunotolerancia, tales como oral, nasal o intraperitoneal. La inducción de inmunotolerancia también se puede conseguir por células dendríticas y péptidos que presentan tetrámeros. Se pueden administrar (por ejemplo, en una composición que también comprende el agente) productos particulares que causan inducción de inmunotolerancia al individuo. Tales productos incluyen citoquinas, tales como citoquinas que favorecen una respuesta Th2 (por ejemplo, IL-4, TGF-β; o IL-10). Se pueden administrar productos o agente a una dosis que causa inducción de inmunotolerancia.

En una realización, los agentes de inducción de inmunotolerancia (inmunotolerancia de linfocito T y anticuerpo) están presentes en una composición que comprende al menos 2, 4, 6 o más agentes que inducen inmunotolerancia a diferentes epítipos de la invención, por ejemplo, a las combinaciones de epítipos anteriormente discutidas en

relación con los agentes que son un producto que comprende más de una sustancia.

Prueba de si una composición es capaz de causar enfermedad celiaca

5 Como se mencionó anteriormente la invención proporciona un método de determinación de si una composición es capaz de causar enfermedad celiaca que comprende detectar la presencia de una secuencia de proteína que es capaz de ser modificada por una transglutaminasa como la secuencia que comprende el agente o epitopo de la invención (tal actividad de la transglutaminasa puede ser una actividad de transglutaminasa intestinal humana).

10 Generalmente esto se realiza usando un ensayo de unión en el que un resto que se une a la secuencia de una manera específica se pone en contacto con la composición y se detecta la formación de complejo secuencia/resto y se usa para establecer la presencia del agente. Tal resto puede ser cualquier sustancia adecuada (o tipo de sustancia) mencionada en el presente documento, y generalmente es un anticuerpo específico. Se puede usar cualquier formato adecuado del ensayo de unión (tal como los mencionados en el presente documento).

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

20 La composición generalmente comprende material de una planta que expresa una proteína de gluten que es capaz de causar enfermedad celiaca (por ejemplo, cualquiera de las proteínas de gluten o plantas mencionadas en el presente documento). Tal material puede ser una parte de la planta, tal como un producto recolectado (por ejemplo, semilla). El material puede ser productos procesados del material vegetal (por ejemplo, tal producto mencionado en el presente documento), tal como una harina o alimento que comprende la proteína de gluten. El procesamiento de material alimenticio y el ensayo en los ensayos de unión adecuados es rutinario, por ejemplo, como se menciona en Kricka L.J., *J. Biolumin. Chemilumin.* 13, 189-93 (1998).

Ensayos de unión

30 La determinación de la unión entre cualquiera de las dos sustancias mencionadas en el presente documento se puede hacer midiendo una característica de una o ambas sustancias que cambia tras la unión, tal como un cambio espectroscópico.

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

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

Kits

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

50 Por tanto, los medios pueden permitir la detección de una sustancia secretada por los linfocitos T después del reconocimiento. Por tanto, el kit puede incluir adicionalmente un resto de unión específico para la sustancia, tal como un anticuerpo. El resto generalmente específico para IFN- γ . El resto generalmente está inmovilizado sobre un soporte sólido. Esto significa que después de la unión al resto la sustancia seguirá en la proximidad del linfocito T que lo secretó. Por tanto, se forman “manchas” del complejo sustancia/resto sobre el soporte, representando cada mancha un linfocito T que está secretando la sustancia. La cuantificación de las manchas, y generalmente la comparación frente a un control, permite la determinación del reconocimiento del agente.

60 El kit también puede comprender un medio para detectar el complejo sustancia/resto. Un cambio detectable se puede dar en el propio resto después de unirse a la sustancia, tal como un cambio de color. Alternativamente, se puede permitir que un segundo resto directa o indirectamente marcado para la detección se una al complejo sustancia/resto para permitir la determinación de las manchas. Como se discutió anteriormente el segundo resto puede ser específico para la sustancia, pero se une a un sitio diferente sobre la sustancia que el primer resto.

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

Además, el kit puede comprender medio para los linfocitos T, restos de detección o tampones de lavado para usarse en las etapas de detección. El kit además puede comprender reactivos adecuados para la separación de la muestra, tal como la separación de CMSP o linfocitos T de la muestra. El kit puede estar diseñado para permitir la detección de los linfocitos T directamente en la muestra sin requerir ninguna separación de los componentes de la muestra.

5 El kit puede comprender un instrumento que permite la administración del agente, tal como la administración intradérmica o epidérmica. Generalmente tal instrumento comprende apósito, vendaje o una o más agujas. El instrumento puede permitir administración balística del agente. El agente en el kit puede estar en forma de una composición farmacéutica.

10 El kit también puede comprender controles, tales como controles positivos o negativos. El control positivo puede permitir que se ensaye el sistema de detección. Por tanto, el control positivo generalmente imita el reconocimiento del agente en cualquiera de los métodos anteriores. Generalmente en los kits diseñados para determinar el reconocimiento *in vitro* el control positivo es una citoquina. En el kit diseñado para detectar el reconocimiento *in vivo* del agente el control positivo puede ser antígeno al cual la mayoría de los individuos debería responder.

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

20 **Anticuerpos**

La invención también proporciona anticuerpos monoclonales o policlonales que específicamente reconocen los agentes (tales como el epítipo de la invención) de la invención, y métodos de producción de tales anticuerpos. Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a estas sustancias de la invención.

Con los propósitos de esta invención, el término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpo tal como Fv, F(ab) F(ab')₂ así como anticuerpos de cadena sencilla.

30 Un método para producir un anticuerpo policlonal comprende inmunizar un animal hospedador adecuado, por ejemplo, un animal experimental, con el inmunógeno y aislar inmunoglobulinas del suero. Por lo tanto, el animal puede ser inoculado con el inmunógeno, posteriormente sacar sangre del animal y purificar la fracción de IgG. Un método para producir un anticuerpo monoclonal comprende inmortalizar células que producen el anticuerpo deseado. Se pueden producir células de hibridoma fusionando células de bazo de un animal experimental inoculado con células tumorales (Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256, 495-497).

35 Se puede seleccionar una célula inmortalizada que produce el anticuerpo deseado por un procedimiento convencional. Los hibridomas se pueden dejar crecer en cultivo o inyectar intraperitonealmente para la formación de fluido de ascitis o dentro de la corriente sanguínea de un hospedador alogénico o hospedador inmunocomprometido. Se puede preparar anticuerpo humano por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos, seguido de transformación de los linfocitos con virus Epstein-Barr.

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

45 El agente o anticuerpo de la invención, puede llevar un marcador detectable. Se prefieren marcadores detectables que permiten la detección de la sustancia secretada por inspección visual, opcionalmente con la ayuda de un medio de ampliación óptica. Tal sistema se basa generalmente en un marcador enzimático que causa cambio de color en un sustrato, por ejemplo, fosfatasa alcalina que causa un cambio de color en un sustrato. Tales sustratos están comercialmente disponibles, por ejemplo, en BioRad. Otros marcadores adecuados incluyen otras enzimas tales como peroxidasa, o marcadores de proteína, tal como biotina; o radioisótopos, tales como ³²P o ³⁵S. Los anteriores marcadores se pueden detectar usando técnicas conocidas.

50 Los agentes o anticuerpos de la invención pueden estar en forma básicamente purificada. Pueden estar en forma básicamente aislada, en cuyo caso generalmente comprenderán al menos 80 %, por ejemplo, al menos 90, 95, 97 o 99 % del péptido, anticuerpo o masa seca en la preparación. El agente o anticuerpo generalmente está básicamente libre de otros componentes celulares. El agente o anticuerpo se puede usar en tal forma básicamente aislada, purificada o libre en el método o estar presente en tales formas en el kit.

55 La invención proporciona agentes terapéuticos (incluyendo profilácticos) o sustancias diagnósticas (los agentes de la invención). Estas sustancias están formuladas para la administración clínica mezclándolas con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se pueden formular para la administración tópica, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, intradérmica, epidérmica o transdérmica. Las sustancias se

pueden mezclar con cualquier vehículo que sea farmacéuticamente aceptable y apropiado para la vía de administración deseada. El vehículo o diluyente farmacéuticamente para la inyección puede ser, por ejemplo, una solución estéril o isotónica tal como Agua para Inyección o solución salina fisiológica, o una partícula vehículo para administración balística.

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

10 Las vías de administración y dosis descritas están previstas solamente como guía puesto que un experto será capaz de determinar fácilmente la vía óptima de administración y la dosis para cualquier paciente particular y afección.

15 Por tanto, las sustancias de la invención se pueden usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, o en un método diagnóstico practicado sobre el cuerpo humano. En particular, se pueden usar en un método de tratamiento o prevención de la enfermedad celiaca. La invención también proporciona los agentes para su uso en un método de fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la enfermedad celiaca. Por tanto, la invención proporciona un método de prevención o tratamiento de la enfermedad celiaca que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo una sustancia de la invención (generalmente una cantidad eficaz no tóxica de la misma).

20 El agente de la invención se puede producir usando técnicas químicas sintéticas estándar, tales como por el uso de un sintetizador automatizado. El agente se puede producir de un polipéptido más largo, por ejemplo, una proteína de fusión, cuyo polipéptido generalmente comprende la secuencia del péptido. El péptido se puede derivar del polipéptido, por ejemplo, hidrolizando el polipéptido, tal como usando una proteasa; o rompiendo físicamente el polipéptido. El polinucleótido de la invención se puede producir usando técnicas estándar, tal como usando un sintetizador.

Desamidación

30 Cuando una sustancia descrita en el presente documento incluye un residuo Gln, la invención también proporciona esa secuencia en la que el residuo Gln se ha desamidado a un residuo Glu. Uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, etc.) residuo(s) Gln por secuencia se pueden desamidar, pero cuando hay más de un residuo Gln, no todos ellos se deben desamidar. Preferiblemente, los residuos Gln que se desamidán son aquellos susceptibles a desamidación por transglutaminasa.

40 En el listado de secuencia se dan ejemplos en los que Gln se pueden desamidar. Por ejemplo, el residuo 4 de la SEQ ID NO: 1 puede ser un residuo Gln o un residuo Glu, el residuo 6 de la SEQ ID NO: 2 puede ser un residuo Gln o un residuo Glu, los residuos 4 y 7 de la SEQ ID NO: 6 pueden ser cada uno independientemente residuos Gln o Glu, etc. Los residuos Gln que son susceptibles a desamidación, y sus homólogos Glu desamidados, se refieren como residuos "Glx".

45 Cuando el agente incluye más de un residuo Glx, estos se pueden disponer en cualquier configuración. Por ejemplo, los residuos Glx pueden ser residuos consecutivos, y/o pueden estar separados por otro u otros más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, etc.) residuos. Como se mencionó anteriormente, para los epítomos HLA-DQ8, el agente preferiblemente comprende un residuo Glx que está separado por siete residuos de otro residuo Glx. Los agentes preferidos de la invención son agentes desamidados, es decir, el agente comprende el uno o más residuos Glx en la forma de Glu. Esto se puede conseguir de diversos modos, por ejemplo, incluyendo residuos Glu durante la producción, o convirtiendo residuos Gln en Glu por desamidación. La conversión de Gln a Glu se puede conseguir tratando un agente que contiene residuos Gln que son susceptibles a desamidación con un agente de desamidación. El uno o más residuos Gln preferiblemente se desamidán a Glu por transglutaminasa, por ejemplo, como se describe en los ejemplos.

55 El experto en la técnica será capaz de determinar que los residuos Gln particulares en el agente son susceptibles a la desamidación y, por tanto, que los residuos deberían ser residuos Glu que surgen de la desamidación de un residuo Gln. Por ejemplo, secuencias que contienen Gln susceptibles de desamidación por transglutaminasa generalmente conforme a un motivo: por ejemplo, QXPX, QXPF(Y), QXX(FYMILVW), QXPF, QXX(FY), PQ(QL)P(FY)P. Por ejemplo, la secuencia PQ(QL)P(FY) P facilita la desamidación de la Q subrayada en la posición 2 por transglutaminasa.

60 En particular, se prefieren agentes que comprendan la versión desamidada de la SEQ ID NO: 200 (en donde tales secuencias no están ya desamidadas). Lo más preferiblemente, los agentes de la invención comprenden la versión desamidada con transglutaminasa de la SEQ ID NO: 200 (de nuevo, donde no está ya desamidada). Los análogos de estos agentes, como se define en el presente documento, también están incluidos dentro del alcance de la invención.

65

Ejemplos (Ejemplos de referencia excepto en tanto que están relacionados con el agente de la presente invención)
– La invención se ilustra por los siguientes Ejemplos no limitantes:

Biblioteca de cribado de epítipo de gliadina inicial

- 5 En los experimentos iniciales que implican 29 individuos HLA-DQ2+ con enfermedad celiaca en dieta libre de gluten a largo plazo, se usaron ensayos ELISPOT de interferón gamma para investigar un Pepset previo (descrito en el documento WO 03/104273) inicialmente como conjuntos de péptidos y a continuación en 15 sujetos como péptidos individuales con y sin desamidación por tTG. Esta biblioteca de Pepset consistía en 652 péptidos de gliadina 20mero
- 10 que abarcaban todos los 12meros únicos contenidos dentro de todas las entradas de Genbank descritas como gliadinas de trigo encontradas en septiembre de 2001. Esta biblioteca de Pepset se diseñó "manualmente" a partir de secuencias de proteína derivadas de gen alineadas usando el programa informático ClustaIW (MegAlign) ordenado en grupos filogenéticos.
- 15 Aproximadamente se proporcionaron 0,6 micromoles de cada uno de los 652 de los 20meros. Dos péptidos 20meros marcadores se incluyeron en cada conjunto de 96 (VLQQHNIAHGSSQVLQESTY - péptido 161, y IKDFHVVYFRESRDALWKGP) y se caracterizaron por HPLC de fase inversa y análisis de secuencia de aminoácidos. Las purezas promedio de estos péptidos marcadores eran de 19 % y 50 %, respectivamente. Los péptidos se disolvieron inicialmente en acetonitrilo (10 %) y Hepes 100 mM a 10 mg/ml. La concentración final de los péptidos individuales incubados con CMSP para los ensayos ELISpot de IFN- γ eran de 20 μ /ml. Estos péptidos se desamidaron por incubación con tTG tisular de conejillo de indias (Sigma T5398) en la relación de 100:32 μ g/ml durante dos horas a 37 °C. Las soluciones peptídicas se almacenaron a -20 °C y eran recién descongeladas antes de usar. Estos estudios se llevaron a cabo en Oxford, UK. Los ensayos ELISpot se realizaron como se describe para los llevados a cabo en Melbourne, Australia (todos los otros estudios descritos en el presente documento). Los datos de "Oxford" en relación con las respuestas del sujeto a péptidos individuales se agruparon con los datos de "Melbourne" para posterior análisis de epítipo "mínimo" en el "algoritmo EM" (véase más adelante).
- 25

Biblioteca de cribado de epítipo de gliadina de la segunda ronda

- 30 Se diseñó una biblioteca de epítipo de gliadina de segunda ronda según las secuencias bioactivas identificadas a partir de la biblioteca de cribado de epítipo de gliadina inicial de 652 20meros. Se definieron los 20meros de gliadina con bioactividad media equivalente a >5 % del 20mero de gliadina más potente (91: PQQFPQLPYPQLPYPQP) en 15 sujetos HLA-DQ2+ evaluados con todos los 652 20meros desamidados. Puesto que los estudios anteriores (véase el documento WO 03/104273) indicaron que conjuntos desamidados de este Pepset eran más potentes que sin desamidación, se identificaron los residuos de glutamina dentro de los 20meros bioactivos potencialmente desamidados por tTG según el motivo QXPX, QXZ (FYWILVM) en el que X es cualquier aminoácido excepto prolina, y P es prolina, Z es cualquier aminoácido, y FYWILVM representa aminoácidos hidrófobos (coherentes con los motivos para desamidación mediada por tTG publicados por Vader W. y col. *J. Exp. Med.* 2002 *J. Exp. Med.* 195:643-649, PCT WO 03/066079, y Fleckenstein B. 2002. *J. Biol. Chem.* 277:34109-16).
- 35
- 40 A continuación, se identificaron péptidos 12mero en los cuales cada sitio de desamidación potencial podría estar en la posición 4, 6 o 7 en el 9mero localizado dentro de la ranura de unión de HLA-DQ2 (anclajes de HLA-DQ2 en estas posiciones muestran una preferencia para glutamato). A continuación, se flaquean las secuencias de epítipo y núcleo 12mero candidatas con glicina seguido del residuo N terminal presente en el polipéptido de gliadina madre y en el C terminal por el residuo C terminal presente en el polipéptido de gliadina madre seguido por glicina (es decir, GXXXXXXXXXXXXXXXXG).
- 45

- Se sintetizaron péptidos con glutamina o glutamato en la posición 9. A continuación, se evaluaron los péptidos (100 μ g/ml) (+/- desamidación por tTG) en ensayos ELISPOT de interferón gamma usando CMSP de 15 voluntarios celíacos HLA-DQ2+ después de exposición a gluten. Se analizaron resultados de estos ensayos según el algoritmo EM (véase más adelante). Además, se sintetizaron los distintos péptidos más potentes y se purificaron a >80 % (Mimotopos) y se evaluaron en ensayos ELISPOT de interferón gamma usando CMSP de 15 voluntarios celíacos HLA-DQ2+ después de exposición a gluten de trigo.
- 50

Biblioteca de cribado de epítipo de gluten completa

- Para hacer práctico el diseño de una biblioteca de péptido sustancialmente mayor que abarque todas las proteínas similares a gliadina y glutenina de trigo, gluten de centeno, cebada y avena (prolaminas), y para confirmar los datos de la biblioteca de péptidos de gliadina previa, se desarrolló un algoritmo iterativo para automatizar el diseño de un conjunto mínimo de 20meros que incluían todos los 12meros únicos (excluyendo las secuencias peptídicas señal) en proteínas de gluten. El algoritmo ScanSet se muestra en la Figura 1.
- 60

- El método ensaya si todos los epítipos peptídicos posibles de un grupo de proteínas son antígenos potenciales en un intervalo de pacientes. Los epítipos de linfocito T oscilan en tamaño entre 9 y 15 AA. Ensayar todos los posibles 12meros en un conjunto de proteínas, llega a ser rápidamente inviable debido a los altos números.
- 65

En el presente documento usamos el hecho de que, por ejemplo, un péptido 20mero puede cubrir hasta 9 12meros diferentes. Por lo tanto, desarrollamos un planteamiento combinatorio para cubrir todos los 12meros posibles representados en una familia de proteínas.

- 5 Se generan péptidos largos de 20 aminoácidos (20mero) que se ensayan como antígenos, y que cubren todas las secuencias de péptido 12mero que existen en el grupo de proteínas. Definimos la longitud de péptidos para generar como *L* (por ejemplo, 20) y la longitud de los epitopos que queremos cubrir como *S*. Desarrollamos un programa informático que genera todos los *L*meros que se dan excepcionalmente de un conjunto de proteínas. Además, generamos todos los *S*meros que se dan excepcionalmente a partir de este conjunto de proteínas. A continuación, seleccionamos un conjunto de *N* *L*meros que contiene todas las secuencias de *L*meros. La Figura 1 perfila cómo funciona este algoritmo.

- 15 El 16 de junio de 2003, los números de acceso contenidos en Genbank para 53 gliadinas alfa/beta, 53 gama y 2 omega, y 77 gluteninas BPM y 55 APM de *T. aestivum*, 59 hordeínas, 14 secalinas y 20 aveninas (véase la Figura 2). En total, ScanSet identificó 18117 12meros únicos contenidos en los 225 productos génicos de gluten.

- 20 Todos los 12meros de gluten únicos se podrían subsumir en 2922 20meros. Estos 20meros se sintetizaron en una biblioteca de péptidos Pepset (Mimotopes Inc., Melbourne, Australia). Se sintetizaron péptidos de Pepset en lotes de 96 (Mimotopes Inc., Melbourne Australia). Se proporcionó aproximadamente 0,7 a 1,3 micromoles de cada uno de los 2922 20meros. Se incluyeron dos péptidos 20mero marcadores en cada conjunto de 96 (un péptido representativo de los otros 94 péptidos sobre cada placa particular, y IKDFHVFRESRDALWKGP) y se caracterizaron por HPLC de fase inversa y espectroscopía de masas. Purezas promedio de estos péptidos marcadores eran de 36 % (intervalo: 5 a 68 %) y 64 % (intervalo: 55 a 71 %), respectivamente.

- 25 Los péptidos se disolvieron inicialmente en acetonitrilo acuoso (50 %). Los péptidos en acetonitrilo acuoso se transfirieron a placas de 96 pocillos estériles y se diluyeron en PBS estéril con calcio 1 mM (250 µg/ml) y, a continuación, se incubaron con tTG (25 µg/ml) (Sigma T5398) durante 6 horas 37 °C y, a continuación, se almacenaron congelados (-20 °C) hasta su uso.

- 30 Todos los sujetos tenían enfermedad celiaca comprobada por biopsia y habían seguido una dieta libre de gluten estricta durante al menos 6 meses. Todos los sujetos poseían *HLA-DQB01*02* (HLA-DQ2) solo (n=100) o *HLA-DQA1*03* y *HLA-DQB1*0302* (HLA-DQ8) solo (n=5). En todos los casos, se evaluó tTG-IgA antes de la exposición a gluten y estaba en el intervalo normal (se encontró que el 30 % de los voluntarios iniciales tenían tTG-IgA elevada y se excluyeron puesto que la exposición a gluten crónica está asociada a fracaso en inducir linfocitos T específicos a gluten en sangre periférica por exposición a gluten limitada). Los voluntarios consumieron "white bread block loaf" de Baker's Delight (200 g diarios durante tres días) o avena de Uncle Tobys (100 g diarios durante tres días). Todos menos tres sujetos completaron la exposición de tres días (un retirado después del primer bocado de pan, y los otros dos vomitaron después de dos rebanadas de pan. Los datos de los dos últimos se incluyeron en el análisis posterior). Se sacó sangre (300 ml) seis días después de comenzar la exposición a gluten. En nuestros estudios previos no se han encontrado respuestas de ELISpot de IFN-γ específicas a péptido de gluten, y por tanto no se evaluó la sangre "pre-exposición" en este conjunto de experimentos (Anderson, R.P. y col. 2000. *Nat. Med.* 6:337-342., los documentos WO 01/25793, WO 03/104273).

- 45 Se realizaron ensayos ELISpot de IFN-γ (Mabtech, Suecia) en placas de 96 pocillos (MAIP S-45, Millipore) en las que cada pocillo contenía 20 µl de solución peptídica y 100 µl de CMSP ($2 \cdot 8 \times 10^5$ /pocillo) en RPMI que contenía 10 % de suero AB humano inactivado por calor. Después del desarrollo y el secado, se evaluaron las placas de ELISpot de IFN-γ usando el contador de placa de ELISpot automatizado MAIP. A continuación, se analizaron los datos según un algoritmo novedoso (Expectación-Maximización: EM) para definir y cuantificar respuestas del interferón gamma a secuencias de 9mero contenidas dentro de la biblioteca de péptidos (véase la Figura 3 y más adelante). A continuación, se racionalizaron péptidos 9mero según un algoritmo que asume la redundancia en el reconocimiento de linfocito T, el algoritmo "IterativeCluster" (véase la Figura 4 y más adelante), dejando grupos de aminoácidos con propiedades químicas similares en una posición cualquiera en el 9mero, o para glutamato para reemplazar glutamina en cualquier posición (asumiendo que puede haber ocurrido desamidación).

- 55 Puesto que había conjuntos de datos de solamente dos individuos HLA-DQ8+ que no eran también HLA-DQ2+, y estos estaban utilizando solamente los 721 20meros de gliadina de trigo de la "biblioteca de cribado de epítoto de gluten completa", se identificaron péptidos bioactivos tomando el rango promedio de respuestas de ELISpot de IFN-γ específica a péptido en los dos sujetos. Para la predicción de probables epítotos de gliadina restringidos a HLA-DQ8, se asumió que un residuo de glutamina susceptible a desamidación mediada por tTG ocupaba o bien la posición 1 o 9 en las regiones núcleo de 9mero potenciales de epítotos, coherentes con el motivo de unión a HLA-DQ8 y los descubrimientos de van de Wal y col. (van de Wal, Y. y col 1998. *J. Immunol.* 161 (4):1.585-1.588).

El algoritmo expectación-maximización (EM) para analizar los datos de ELISpot:

- 65 La Figura 3 muestra un algoritmo para analizar datos que vienen de un ensayo que usa el ELISpot. Las respuestas de linfocito T a diferentes péptidos se miden en placas de 96 pocillos usando ensayos de linfocito T. Los ensayos se

realizaron sobre muchos pacientes usando muchos antígenos peptídicos diferentes. El resultado de los ensayos de linfocito T se pueden resumir en una tabla en la que las filas representan péptidos y las columnas pacientes y las mediciones individuales (recuentos) están en la tabla (por ejemplo, véase la Figura 3B). El propósito del algoritmo EM es diferenciar entre respuesta y no respuesta de un paciente a un péptido y estimar un índice medio de respuesta y una proporción de personas que responden a cada péptido.

Las respuestas se midieron para un número de diferentes pacientes (i se usará para indicar el paciente) y para muchos péptidos diferentes (j se usará para indicar el péptido). Cada medición (y_{ij}) representa un recuento de linfocitos T del paciente i que responde al péptido j . Para estimar, si una medición para un cierto péptido en un paciente se puede llamar una respuesta o si es más probable que venga de una distribución de fondo, proponemos un modelo para un problema de datos incompletos, siendo y_{ij} el recuento observado de manchas y z_{ij} un indicador no observado, si la persona i responde al péptido j .

El número observado de recuentos y_{ij} se modeliza para venir de distribuciones de Poisson independientes: poisson (α_i, λ_j), si el paciente i está respondiendo al péptido j , es decir, $z_{ij}=1$, y poisson (α_i, λ_0), si el paciente i no está respondiendo al péptido j , es decir, $z_{ij}=0$.

- Datos completos y_{ij} (recuentos observados), z_{ij} (indicador de respuesta, no observado).
- Parámetros: $\theta=(\alpha_i, \lambda_j, \lambda_0, p_j)$

- α_i : capacidad de respuesta total del paciente.
- λ_j : tasa de respuesta inducida por péptido.
- λ_0 : tasa de respuesta de fondo.
- p_j : proporción de personas que responden al péptido j .

Algoritmo EM:

- Variables de conjunto inicialmente a valores aleatorios
- Etapa E: calcular probabilidad
- Etapa M: maximizar función de probabilidad
- Iterar Etapa E y M

Procedimiento iterativo para encontrar el conjunto mínimo de epítomos que responden

Se desarrolló un programa para calcular un conjunto mínimo de péptidos para su uso en una vacuna basada en las respuestas de linfocito T estimadas en el algoritmo EM. Medimos las respuestas del linfocito T a L meros de un grupo de proteínas. Los péptidos se generaron para cubrir todos los posibles Smeros. Estimamos los siguientes parámetros para la respuesta por un algoritmo EM: tasa de respuesta, número de personas que responden, proporción de personas que responden. La proporción de personas que responden multiplicadas por la tasa estimada de respuesta se usa como criterio para definir los epítomos que son buenos antígenos. Muchos de los L meros medidos contienen los mismos epítomos Smero. Para encontrar los epítomos (Smeros) que pueden explicar todas las respuestas en L meros seleccionamos el Smero que está contenido en L meros que en la media tienen las respuestas más altas. A continuación, separamos todos los L meros que contienen este Smero de nuestras mediciones. Luego, seleccionamos el Smero con las respuestas más altas en los L meros restantes. Iteramos este procedimiento hasta que no existan Smeros con respuestas mayores de un límite especificado. Usamos varias iteraciones con diferentes límites. Este proceso se esboza en la Figura 4. Dicha lista definida de L meros agrupados se puede usar como base para definir los epítomos óptimos y seleccionar péptidos que funcionan como antígenos buenos.

Epítomos de HLA-DQ2 en gluten de trigo

Se identificaron epítomos de HLA-DQ2 en gliadinas de trigo y gluteninas usando CMSP recogida el día 6 después de comenzar la exposición a gluten en un total de 76 individuos HLA-DQ2+ en ensayos ELISPOT de interferón gamma (biblioteca de epítomo de gliadina inicial: $n=15$, biblioteca de cribado de epítomo de gliadina de la segunda ronda: $n=15$, biblioteca de cribado de epítomo de gluten completa: $n=46$). Todos los datos relacionados con respuestas peptídicas individuales en sujetos celíacos se agruparon y analizaron por el algoritmo EM.

Se identificaron una serie de secuencias de 9mero y se ordenaron según la intensidad de las respuestas de gamma interferón y la proporción de individuos que responden (véase la Figura 5). Muchas de las secuencias identificadas se podrían agrupar en "superfamilias" que permiten que varios aminoácidos diferentes con propiedades químicas similares se presenten en una posición cualquiera en el epítomo putativo (véase la Figura 6). Por ejemplo, en la "Secuencia 1" de la Figura 6 (SEQ ID NO: 1555) P(QR)P(QE)LP(FY)PQ, glutamina (Q) o arginina (R) ambas son aceptadas en la posición 2 excepto que Q genera un epítomo sustancialmente más bioactivo.

Revisando las 110 secuencias de 9mero más “activas” identificadas por el algoritmo EM, la “lista” de motivos 9mero se podría abreviar en 41 9meros, muchos de los cuales solapados (por ejemplo, “Secuencia 1” y “2” (SEQ ID NO: 1555 y 1558 respectivamente) se solapan por 7 residuos y ambas están presentes en la A-gliadina 57-73 QE65). En casos seleccionados, se sintetizaron péptidos de alta calidad y se confirmó la bioactividad de los péptidos identificados por el algoritmo EM (véase la Figura 7).

Epítotos de HLA-DQ2 en aveninas de avena

Se evaluaron péptidos de avenina después de la exposición a avena (n=30 sujetos) o después de pan de trigo (n=8) en sujetos celíacos HLA-DQ2+. Se encontraron respuestas de ELISPOT para los péptidos encontrados en la Figura 8. Uno de los péptidos de avenina reactivos era homólogo a una secuencia en gluten de trigo (SEQ ID NO: 1590).

Estudios de péptido de alta calidad de avena (avenina)

Se evaluaron péptidos de avenina de alta calidad 3 días después de completar la exposición a avena con avena libre de trigo pura, 100 g/d durante 3 días (respuestas de ELISPOT de interferón gamma de CMSP “día 6”). Estos péptidos se diseñaron sobre péptidos previamente definidos usando la biblioteca de péptidos de avenina de grado de cribado (“primera ronda”) y sobre sitios de desamidación potenciales. Había 25 péptidos (como 16meros) con pureza verificada por HPLC como >80 %, y las secuencias confirmadas por espectroscopía de masas.

Las respuestas de ELISPOT de interferón gamma a los péptidos de avenina de alta calidad seguido de desamidación por tTG se compararon en 18 sujetos con enfermedad celíaca DQ2+.

Los péptidos dominantes (>70 % de respuesta máxima) después de exposición a avena incluían: EQQFGQNI FSGFSVQL (SEQ ID NO: 1764) (11/18 sujetos), QLRCPAIHSVVAAIL (SEQ ID NO: 1765) (4/18 sujetos), y QYQPYEQEQPILQQQ (SEQ ID NO: 1766) (3/18 sujetos). 2/18 sujetos no tenían respuestas específicas a avenina (definido por SFU (unidades formadoras de mancha) >3xblanco) y SFU máximo medio de 6/18 sujetos era menos de 10. Dos péptidos adicionales provocaron respuestas positivas: QIPEQLRCPAIHSVQ (SEQ ID NO: 1767) (3/18 sujetos) y EQYQPEQQPFMQPL (SEQ ID NO: 1768) (>40 % de respuesta peptídica máxima en 5/18 sujetos). El panel de 25 péptidos incluía varios péptidos similares al péptido 1490 (SEQYQPYEQQEPFVQ) publicado en Arentz-Hansen, *PLoS Medicine* (oct. 2004, vol. 1, artículo 1 (84-92), sin embargo, ese péptido indujo una fuerte respuesta positiva en solamente un sujeto, y respuesta más débil en 5 sujetos.

Las respuestas de ELISPOT de interferón gamma a péptidos de avenina de alta calidad estaban ausentes antes de la exposición a gluten y se bloquearon por pretratamiento de CMSP con anticuerpo anti-HLA DQ pero no anti-HLA DR.

Bibliotecas de péptidos de cribado de centeno y cebada

Se evaluaron bibliotecas de péptidos de la primera ronda 20 mero de hordeína y secalina 3 días después de completar la exposición a centeno (pan, 100 g/d durante 3 días) o cebada (hervida, 100 g/d durante 3 días) (respuestas de ELISPOT de interferón gamma de CMSP “6 días”). Aunque el análisis iterativo que usa las bibliotecas de péptidos de la 2^o y 3^a ronda para definir epítotos no se ha realizado aún, los 20meros pretratados con tTG encontrados para inducir respuestas “potentes” compartían considerable similitud estructural con los péptidos bioactivos identificados después de la exposición a trigo. Sin embargo, las secuencias peptídicas dominantes después de exposición a centeno o cebada no incluían péptidos con la secuencia PQQPLPY que se encontró que es dominante después de la exposición a trigo. El 20mero dominante (>70 % de respuesta máxima) después de la exposición a centeno era normalmente PQQLFPLPQQPFPQPPQ (SEQ ID NO: 1769) (8/14 sujetos), u ocasionalmente QPFPQPPQPTPIQPQQPFPQ (SEQ ID NO: 1770) (4/14), QQPQQLFPQTQQSSPQQPQQ (SEQ ID NO: 1771) (1/14), PQTQQPQQPFPQPPQQLF (SEQ ID NO: 1772) (1/14) y/o QEQREGVQILLPQSHQQLVG (SEQ ID NO: 1773) (1/14). Péptidos adicionales indicados para más del 40 % de respuesta máxima en al menos 1 sujeto incluyen:

FPQQPQQPFPQPPQQLPLQP (SEQ ID NO: 1774) (3/14, 2 > 70 %)
 PQQPFPQQPEQIIPQQPQQP (SEQ ID NO: 1775) (5/14, 3 > 70 %)
 QQLPLQPQQPFPQPPQPIPQ (SEQ ID NO: 1776) (6/14, 2 > 70 %)
 QQPQQPFPPLPQQPVPQQPQ (SEQ ID NO: 1777) (3/14, 1 > 70 %)
 SIPQQPFPFPQPPQPPQSQ (SEQ ID NO: 1778) (4/14, 1 > 70 %)
 QTQQSIPQQPFPQPPQPPQ (SEQ ID NO: 1779) (3/14, 1 > 70 %)
 NMQVGPSPGQVEWPQQQPLPQ (SEQ ID NO: 1780) (2/14, 1 > 70 %)
 VGPSGQVSWPQQQPLPQQPQ (SEQ ID NO: 1781) (2/14, 2 > 70 %)
 QQPFLLPQQPFSQPQQPFL (SEQ ID NO: 1782) (1/14, 1 > 70 %)
 FPLPQQPFPQQPEQIISQQ (SEQ ID NO: 1783) (5/14, 1 > 70 %)
 PQQPQRPFQAQQPEQIISQQP (SEQ ID NO: 1784) (3/14, 1 > 70 %)
 SPQQQLPFPQPPQPPFVVVV (SEQ ID NO: 1785) (4/14, 1 > 70 %)
 QQPSIQLSLQQQLNPCKNVL (SEQ ID NO: 1786) (1/14, 1 > 70 %)

Generalmente, los péptidos dominantes después de la exposición a cebada incluían uno de seis motivos peptídicos, o eran uno de otros ocho 20meros individuales “dominantes” en solamente uno de los 17 sujetos después de la exposición a cebada. Los seis motivos identificados:

- 5 QQPQPQPYPY (SEQ ID NO: 1787)
 PFPQPQPFPW (SEQ ID NO: 1788)
 LQPQPFPQ (SEQ ID NO: 1789)
 PQPQASPL (SEQ ID NO: 1790)
 IIPQPQP (SEQ ID NO: 1791)
 10 YPEQPQP (SEQ ID NO: 1792)

Los péptidos de hordeína de cebada que muestran al menos 40 % de respuesta peptídica máxima en al menos un sujeto incluyen los siguientes, en los que un asterisco indica los ochos péptidos individuales que muestran la respuesta máxima en un único individuo:

- 15 QQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1793) (8/17, 2 > 70 %)
 QQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1794) (9/17, 8 > 70 %)
 PQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1795) (5/17, 1 > 70 %)
 PQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1796) (6/17, 2 > 70 %)
 20 YQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1797) (6/17, 2 > 70 %)
 QQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1798) (7/17, 2 > 70 %)
 QQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1799) (5/17, 2 > 70 %)
 PQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1800) (1/17, 1 > 70 %)*
 QQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1801) (10/17, 2 > 70 %)
 25 PFPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1802) (6/17, 3 > 70 %)
 WQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1803) (9/17, 5 > 70 %)*
 PWQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1804) (1/17, 1 > 70 %)
 QQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1805) (5/17, 1 > 70 %)
 PQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1806) (6/17, 2 > 70 %)*
 30 QQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1807) (4/17, 1 > 70 %)*
 QSQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1808) (1/17, 0 > 70 %)
 PFPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1809) (1/17, 0 > 70 %)
 FPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1810) (1/17, 0 > 70 %)
 PFPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1811) (6/17, 0 > 70 %)
 35 FPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1812) (2/17, 1 > 70 %)
 FPLQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1813) (1/17, 0 > 70 %)
 QQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1814) (1/17, 0 > 70 %)
 SPLQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1815) (1/17, 0 > 70 %)
 PQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1816) (1/17, 1 > 70 %)
 40 PQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1817) (1/17, 1 > 70 %)*
 PVLSPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1818) (1/17, 1 > 70 %)
 RQLPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1819) (1/17, 1 > 70 %)
 QGSEQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1820) (7/17, 3 > 70 %)*
 PQGSEQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1821) (2/17, 1 > 70 %)
 45 QPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1822) (4/17, 1 > 70 %)
 PFPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1823) (1/17, 1 > 70 %)
 QKYPEQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1824) (1/17, 1 > 70 %)
 FQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP (SEQ ID NO: 1825) (3/17, 1 > 70 %)
 QIPYVHPSILQQLNPCKVFL (SEQ ID NO: 1826) (1/17, 1 > 70 %)
 50 LAAQLPAMCRLEGGGGLLAS (SEQ ID NO: 1827) (1/17, 1 > 70 %)
 PYPPEELSPQYQIPTPLQPQP (SEQ ID NO: 1828) (1/17, 1 > 70 %)*
 VSPHPGQQTTVSPHQGQQT (SEQ ID NO: 1829) (1/17, 1 > 70 %)*

Bibliotecas de péptidos de glutenina y gliadina de trigo de la segunda y tercera ronda

- 55 La biblioteca de gliadina y glutenina de trigo de la segunda ronda se diseñó sobre las secuencias de péptidos de gliadina y glutenina de trigo 20mero que inducían al menos 5 % de la respuesta (ELISPOT de interferón gamma) estimulada por el péptido 20mero pretratado (enzimáticamente desamidado) por transglutaminasa (tTG) más activo en cualquier sujeto. Se evaluaron todos los péptidos 16mero de la 2ª ronda en al menos 18 sujetos. La biblioteca de
 60 la 2ª ronda generada a partir de la biblioteca de 20mero de gliadina de “Oxford” se había evaluado en diez sujetos – estos datos se mezclaron con los datos generados a partir de los 18 sujetos usados para evaluar la nueva biblioteca de gliadina/glutenina de la 2ª ronda (ampliada). Por lo tanto, se evaluaron péptidos 16mero individuales pretratados con transglutaminasa en o bien 18 (novedosas secuencias de gliadina/glutenina basadas en la biblioteca de 20mero de “Melbourne”) o 28 sujetos (secuencias de gliadina basadas en la biblioteca de 20mero de “Oxford”). Todos los
 65 16meros identificados para la biblioteca de Oxford de la segunda ronda también cumplieron los criterios de selección para la biblioteca de la segunda ronda de Melbourne.

Los datos de la biblioteca de péptidos de la segunda ronda se analizaron según la “dominancia” de respuestas peptídicas en el ELISPOT de interferón gamma en sujetos individuales, es decir, el porcentaje de respuesta de una CMSP del individuo a un péptido específico normalizado frente a esa respuesta inducida por péptido máxima del individuo. Las secuencias de los péptidos que estimularon al menos el 40 % de la respuesta específica a péptido máxima en al menos un sujeto se muestran en la Tabla 1 de a continuación. El conjunto de datos apoya la consistencia y la “dominancia” de los péptidos que se ajustan a las secuencias identificadas usando la primera biblioteca de péptido 20mero de la primera ronda usando el algoritmo Expectación-Maximización (EM) anteriormente descrito.

10 *Tabla 1: Péptidos confirmados en la biblioteca de la segunda ronda como al menos el 40 % tan activos como el péptido con la actividad máxima en un sujeto cualquiera: clasificados según la potencia de la familia de péptido*

Péptido	SEQ ID NO:	>70 %	40-70 %	10-40 %	<10 %
G-QLPYPQPQLPYPQP-G	1830	18/28	4/28	3/28	3/28
G-LQPFQPQLPYPQP-G	1831	14/28	8/28	Nada	6/28
G-LQPFQPQLPFPQP-G	1832	4/28	8/28	5/28	10/28
G-LQPFQPQLPYLQP-G	1833	1/28	1/28	12/28	14/28
G-LQPFQPQLPYSQP-G	1834	2/28	3/28	12/28	11/28
G-LQPFQPQLSYSQP-G	1835	Nada	1/28	2/28	25/28
G-QQPFQPQQPFPWQ-G	1837	9/28	8/28	5/28	6/28
G-QQPFQPQQPIPVQ-G	1838	8/28	5/28	7/28	8/28
G-QQPFQPQQPFSQQ-G	1839	4/28	7/28	8/28	9/28
G-QQPFQPQQPFCQQ-G	1840	2/28	2/28	13/28	11/28
G-GLERPWQQQLPPQ-G	1841	2/18	1/18	Nada	15/18
G-QTFPHQPQQAFPQP-G	1842	1/28	2/28	Nada	25/28
LQQQCSPVAMPQLAR	1843	1/28	1/28	11/28	15/28
QQQQGYYPISPSGQ	1844	1/18	1/18	1/18	15/18
PGQQSGYYPTSPQQS	1845	1/18	1/18	Nada	16/18
QQQPGYYPTSPQQIGQ	1846	1/18	1/18	1/18	15/18
QQQSGYYPTSPQQSG	1847	1/18	Nada	2/18	15/18
QQGYPTSPQQSGGQ	1848	Nada	1/18	Nada	17/
QQQQGYPTSPQQPPQ	1849	Nada	1/18	Nada	Nada
QQGYYPISPQLGQQQ	1850	Nada	1/18	Nada	Nada
YVPPDCSTINVPYANI	1851	1/18	1/18	1/18	15/18
IIMQQEQQEQRQGVQI	1852	1/28	Nada	8/28	19/28
VAHAIIHQQQQQQQE	1853	Nada	1/28	2/28	25/28
G-QPIPQQPQQPFLQ-G	1854	1/28	Nada	5/28	
G-FPQLQQPQQPFPQQ-G	1855	1/28	Nada	1/28	26/28
G-FPQTQQPQQPFPQQ-G	1856	Nada	1/28	2/28	25/28
G-QPLSQPQQTFPQQ-G	1857	Nada	1/28	Nada	27/28
G-QQPQQPQQPFPQQ-G	1858	Nada	1/28	5/28	22/28
G-FPQPQQPQQPFPQQ-G	1859	Nada	1/28	3/28	25/28
G-FPQPQQPQQSFPQQ-G	1860	Nada	1/28	1/28	26/28
G-QPQQTFPQQQLPF-G	1861	1/18	Nada	2/18	15/18
G-MQVDPGQVQWPQQ-G	1862	1/18	Nada	Nada	17/18
G-IQVDPGQVQWPQQ-G	1863	1/18	Nada	Nada	17/18
G-MQADPSGQVQWPQQ-G	1864	1/18	Nada	Nada	17/18
G-MQVDPSSQVQWPQQ-G	1865	1/18	Nada	Nada	17/18
G-QQEQQILQQILQQQ-G	1866	1/18	Nada	Nada	17/18
VPLYRTTTSVPFVGT	1867	1/18	Nada	Nada	17/18
LQTLPSMCNVYIPPYC	1868	1/18	Nada	Nada	17/18
LALQTLPAMCNVYIPP	1869	1/18	Nada	Nada	17/18
DAIRAIYSIVLQEQQ	1870	1/18	Nada	Nada	17/18
G-QQQFSQPQQPFPQP-G	1871	Nada	5/28	7/28	16/28
G-FFPQPQQPFPQPQQ-G	1872	Nada	1/28	10/28	17/28
G-FPQPQQPQQPFPQP-G	1873	Nada	1/28	Nada	27/28
G-QQPFQPQQQFPQP-G	1874	Nada	1/28	12/28	15/28
G-QPQFPLPQLPYPQP-G	1875	Nada	4/28	9/28	15/28
G-QQPFQPQQQLPQP-G	1876	Nada	3/28	6/28	19/28
G-LPFPQPQQPLPQP-G	1877	Nada	2/18	4/18	12/18
G-QQAFPQPQQTFFHQ-G	1878	Nada	3/28	8/28	17/28
G-QQPFTQPQQPTPIQ-G	1879	Nada	1/28	4/28	23/28
G-QQIFPQPQQTFPHQ-G	1880	Nada	1/28	10/28	17/28
G-QQQFIQPQQPFPQQ-G	1881	Nada	2/28	11/28	15/28

(Continuación)

Péptido	SEQ ID NO:	>70 %	40-70 %	10-40 %	<10 %
G-QPFPLQPQQPFPQQ-G	1882	Nada	2/28	7/28	19/28
G-QFPWPQPQQPFPQQ-G	1883	Nada	2/28	8/28	18/28
G-QPTPIQPQQPFPQQ-G	1884	Nada	2/28	5/28	21/28
G-QVSFQQPQQYPS-G	1885	Nada	2/28	4/28	22/28
G-FFQQPQQYPSQQ-G	1886	Nada	1/28	1/28	26/28
G-GKSQVLQQSTYQLL-G	1887	Nada	2/18	1/18	15/18
GQVVNNHGQTVFNDIG	1888	Nada	1/18	4/18	
G-QPQLPFPQQPQQF-G	1889	Nada	1/28	2/28	25/28
G-QFPQPQQAQLPFP-G	1890	Nada	1/28	2/28	25/28
G-HQQPGQRQQGYPT-G	1891	Nada	1/18	1/18	16/18
G-HQQFPQQIPWQP-G	1892	Nada	1/18	1/18	16/18
LEAVTSIALRTLPTMC	1893	Nada	1/18	1/18	
G-QQPQFSQQQIPVI-G	1894	Nada	1/18	Nada	17/18

La biblioteca de péptidos de la tercera ronda consistía en 74 péptidos basados en secuencias estructuralmente distintas en la biblioteca de la segunda ronda encontrada que induce al menos 10 % de la respuesta máxima a cualquier péptido en cualquier sujeto. Estos péptidos corresponden a secuencias de tipo natural (no desamidadas) virtualmente idénticas a las usadas en la biblioteca de la segunda ronda. La distinta característica de esta biblioteca era que consistía en péptidos con pureza verificada por HPLC como >80 %, y con secuencias confirmadas por espectroscopía de masas.

Se compararon las respuestas de ELISPOT de interferón gamma a los péptidos de la biblioteca de la 3ª ronda después de desamidación por tTG en 14 sujetos. Una vez más, las secuencias que incluían el motivo PQPQLPY eran "dominantes" en 9/14 sujetos. Sin embargo, PFPQPQQPFPW (SEQ ID NO: 1895) estimuló >70 % de respuesta máxima en 1/14 sujetos, PFPQPQQPFPQ (SEQ ID NO: 1896) en 1/14, PQPFLPQLPYPQP (SEQ ID NO: 1897) en 1/14, QFPQPQQPQQP (SEQ ID NO: 1898) en 4/14 (incluyendo 3 sujetos en los que los péptidos PQPQLPY no son epítomos potentes) SGQGVSQSQQSQQQ (SEQ ID NO: 1899) en 2/14 (incluyendo uno en el que los péptidos PQPQLPY no son potentes), QYEVIRSLVRLTPNM (SEQ ID NO: 1900) y GLARSQMLQQSICHVG (SEQ ID NO: 1901) cada uno en un sujeto (el mismo) en el que los péptidos PQPQLPY no son epítomos potentes, RTTTSVPFGVGTGVGA (SEQ ID NO: 1902) en 1/14 sujetos y AIHTVIHSIIMQQEQQ (SEQ ID NO: 1903) en 1/14 sujetos.

Muchas de las secuencias ensayadas en la tercera ronda estaban estructuralmente relacionadas y las respuestas del sujeto individual estaban presentes o ausentes según el "parentesco" de ciertas secuencias, sugiriendo redundancia de péptidos reconocidos por linfocitos T específicos a gluten inducidos por exposición a gluten *in vivo*.

Las respuestas de ELISPOT de interferón gamma a los péptidos de la 3ª ronda estaban ausentes antes de la exposición a gluten, y se bloquearon por pretratamiento de CMSP con anticuerpo anti-HLA DQ pero no HLA DR.

Combitopos

El asunto de la redundancia de epítomo y la utilidad potencial en diagnóstico y terapéutica de péptidos diseñados para combatir epítomos dominantes "únicos" se abordó comparando respuestas de ELISPOT de interferón gamma después de exposición a trigo (n=16 sujetos con enfermedad celiaca HLA DQ2), centeno (n=17) o cebada (n=13) a las secuencias: QLQFPQPPELPYPQPQL (SEQ ID NO: 1904) ("P04724E"), QPEQFPQPPEQFPWQP (SEQ ID NO: 1905) ("626fEE"), y QLQFPQPPELPYPQFPQPQPEQFPQPPEQFPWQP (SEQ ID NO: 1906) ("Combitopo"). Después de la exposición a centeno y cebada la suma de las respuestas medias de ELISPOT (unidades formadoras de mancha) a P04724E y 626fEE eran casi idénticas (99 %, y 102 %, respectivamente) a la respuesta a una concentración similar (óptima) del Combitopo. Sin embargo, después de la exposición a trigo (n=16 sujetos), la respuesta de P04724E media era 89 % de esa a Combitopo, y las respuestas de 626fEE medias eran 70 % de la respuesta a Combitopo. Estos descubrimientos serían coherentes con la considerable redundancia de estas secuencias de epítomo relacionadas, P04724E y 626fEE, después de la exposición a trigo pero no después de centeno o cebada, y que combinar las secuencias de epítomo dominantes dentro de péptidos más largos no reduce su disponibilidad biológica. Por lo tanto, los combitopos derivados de epítomos potentes seleccionados pueden ser dispositivos de administración eficientes para terapéutica y diagnóstico basados en epítomo de linfocito T en enfermedad celiaca.

Epítomos en gluten de trigo asociado con la enfermedad celiaca HLA-DQ8+

Se identificaron epítomos en gliadinas de trigo usando CMSP después de exposición a gluten en dos individuos, un homocigoto HLA-DQ8, y un heterocigoto HLA-DQ8. Las respuestas de linfocito T inducidas en otros individuos celíacos HLA-DQ8 (no DQ2) respondieron débilmente a la exposición a gluten y sus datos no permitieron análisis

detallado.

20meros desamidados que incluían la secuencia núcleo: QGSFQPSQQ (SEQ ID NO: 1907), correspondientes al epitopo conocido de gliadina alfa restringido a HLA-DQ8 (en el que Q1 y Q9 están desamidados por tTG para actividad óptima), indujeron respuestas peptídicas moderadamente fuertes. Sin embargo, una serie de péptidos “núcleo” se asociaron con respuestas más potentes en 20meros derivados de gliadinas gamma y omega (véase la Figura 9). Los péptidos más potentes poseían glutamina en una secuencia que sugeriría susceptibilidad a desamidación separada por siete residuos de una segunda glutamina también susceptible a desamidación (como se encontró en QGSFQPSQQ (SEQ ID NO: 1907)) sugiriendo que estas secuencias desamidadas llegarían a ser ligantes de alta afinidad para HLA-DQ8 después de desamidación por tTG. (El motivo de unión para HLA-DQ8 favorece el glutamato en posiciones 1 y 9) Un grupo adicional de 20meros poseían residuos de glutamina susceptibles a desamidación pero no separados por siete residuos de una segunda glutamina susceptible a desamidación mediada por tTG.

15 **Epítos de gliadina y glutenina de la enfermedad celiaca HLA DQ8**

Cinco sujetos con enfermedad celiaca que poseían alelos de HLA DQ2 y HLA DQ8 se sometieron a exposición a gluten de trigo. Se usaron CMSP de dos sujetos inicialmente expuestos para investigar la biblioteca de 20mero de gliadina de trigo de “Melbourne” de la primera ronda. Las secuencias de 20mero identificadas usando CMSP de estos dos sujetos HLA DQ8 CD se analizaron más por cribado, en cinco sujetos HLA DQ8+ DQ2- CD que incluían los dos sujetos originales, una biblioteca de segunda ronda basada en 20meros reactivos en la biblioteca de la 1ª ronda. La biblioteca de la 2ª ronda consistía en 16meros de solapamiento de grado de cribado, y 13meros previstos para corresponder a productos de desamidación mediada por tTG de epítos con el potencial para desamidación de glutamina en la posición 1 y/o posición 9 (coherente con el motivo de unión del péptido de HLA DQ8). Además, los 1400 20meros pretratados con tTG de glutenina (APM y BPM) en la biblioteca de gluten de trigo de “Melbourne” también se investigaron en estos cinco sujetos.

Los 16meros de gliadina más potentes y consecuentemente dominantes eran las secuencias relacionadas VYIPPYCTIAPFGIFG (SEQ ID NO: 1908) (3/5 sujetos con >70 % de respuesta máxima a 16mero de gliadina) y AMCNVYIPPYCAMAPF (SEQ ID NO: 1908) también dominante en 3/5 sujetos (4/5 sujetos producían respuestas dominantes a uno o ambos de estos péptidos). Además, se identificó una serie de péptidos derivados de 20meros bioactivos previamente identificados cuyas respuestas en el ELISPOT se aumentaban o eran permisivas a los residuos de glutamina específicos que están desamidados: (QE) QPTPIQP (QE) (SEQ ID NO: 1909), (QE) QPFPLQP (QE) (SEQ ID NO: 1910), (QE)QPIPVQP(QE) (SEQ ID NO: 1911), (QE) QPQQPFP (QE) (SEQ ID NO: 1912), (QE) QP (QE) LPFP (QE) (SEQ ID NO: 1913), (QE) GSFQPSQ (QE) (SEQ ID NO: 1914) (epítipo de HLA DQ8 previamente publicado, van der Wal 1998), (QE) LPFP (QE) QP (QE) (SEQ ID NO: 1915), y (QE) QPFP (QE) QP (QE) (SEQ ID NO: 1916).

El cribado de la biblioteca de 20mero de glutenina identificó una serie adicional de secuencias que eran dominantes en al menos uno de los cinco sujetos. Los péptidos 20mero dominantes compartían los motivos o tenían las secuencias: PQQQQQLVQQQ (SEQ ID NO: 1917), QGIFLQPH (LQ) I (AS) QLEV (SEQ ID NO: 1918), QPGQGQQG(HY) Y (SEQ ID NO: 1919), QSRYEAIRAI(FY) S (SEQ ID NO: 1920), RTTTSVFPD (SEQ ID NO: 1921), QPPFWRQQP (SEQ ID NO: 1922), Q (PS) (PS) (FI) (PS) QQQQ (SEQ ID NO: 1923), (QPLR) GYYPTSPQ (SEQ ID NO: 1924) (epítipo de HLA DQ8 previamente identificado, van der Wal 2001), QGSYYPGQASPQ (SEQ ID NO: 1925), GYYPTSSLQPEQQGQYYPT (SEQ ID NO: 1926), y QGQQLAQGGQQPAQVQQG (SEQ ID NO: 1927). Los péptidos de glutenina se evaluaron después de pretratamiento con transglutaminasa. Por lo tanto, no se conoce el requerimiento para la desamidación para estos epítos.

Se ha evaluado una biblioteca completa de péptidos de grado de cribado “no caracterizados” que incluyen todas las secuencias 12mero únicas codificadas por genes presentes en Genbank definidos como gluten de trigo (*Triticum aestivum*) (para hacer pan), centeno, cebada o avena, gliadina, glutenina, secalina, hordeína o avenina usando linfocitos T de voluntarios con enfermedad celiaca HLA DQ2+ (y en algunos casos HLA DQ8+) seis días después de comenzar la exposición a gluten *in vivo*. Se ha identificado un patrón relativamente coherente de jerarquía de epitopo en enfermedad celiaca HLA DQ2 que es similar a, pero no idéntico, después del consumo de otros granos tóxicos en enfermedad celiaca. Los péptidos con la secuencia PQPQLPY son dominantes después de la exposición a trigo en al menos dos tercios de la enfermedad celiaca HLA DQ2+, pero otros epítos son ocasionalmente dominantes mientras los péptidos PQPQLPY son básicamente inactivos en menos de uno de seis sujetos HLA DQ2+ con enfermedad celiaca. La contribución de los epítos dominantes raros será mejor evaluada después del cribado de grandes números (por ejemplo, >30) de sujetos (en progreso). La jerarquía de epitopo después del consumo de centeno y cebada es similar a la de después de trigo con la excepción de que los péptidos desamidados similares a las secuencias de gliadina/hordeína/secalina PQPQQPFP o PFPQQPQP son normalmente dominantes en vez de PQPQLPY (una secuencia única a gliadinas alfa de trigo). Los combitopos que comprenden epítos de gluten que se solapan serial y parcialmente son tan activos o más activos que los epítos sencillos solos y ofrecen un medio de administración eficaz de epítos de gluten múltiples durante el reconocimiento del linfocito T. Por lo tanto, tales combitopos son útiles en el diseño y administración de terapias peptídicas en enfermedad celiaca que guía epítos de linfocito T único múltiples.

Referencias

1. Molberg O., y col. *Nature Med.* 4, 713-717 (1998).
2. Quarsten H., y col. *Eur. J. Immunol.* 29, 2.506-2.514 (1999).
- 5 3. Greenberg C.S. y col. *FASEB.* 5, 3.071-3.077 (1991).
4. Mantzaris G., Jewell D. *Scand. J. Gastroenterol.* 26, 392-398 (1991).
5. Mauri L., y col. *Scand. J. Gastroenterol.* 31, 247-253 (1996).
6. Bunce M., y col. *Tissue Antigens* 46, 355-367 (1995).
7. Olerup O., y col. *Tissue antigens* 41, 119-134 (1993).
- 10 8. Mullighan C.G., y col. *Tissue-Antigens.* 50, 688-92 (1997).
9. Plebanski M. y col. *Eur. J. Immunol.* 28, 4.345-4.355 (1998).
10. Anderson D.O., Greene F.C. "The alpha-gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes". *Theor Appl. Genet.* (1997) 95:59-65.
- 15 11. Arentz-Hansen H., Korner R., Molberg O., Quarsten H., Van der Wal Y., Kooy YMC, Lundin KEA, Koning F., Roepstorff P., Sollid LM, McAdam SN. "The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase". *J. Exp. Med.* 2000; 191:603-12.
12. Vader LW, de Ru A., van der Wal, Kooy YMC, Benckhuijsen W., Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P., Koningm F. "Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease". *J. Exp. Med.* 2002; 195:643-649.
- 20 13. van der Wal Y., Kooy Y., van Veelan P., Pena S., Mearin L., Papadopoulos G., Koning F. "Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity". *J. Immunol.* 1998; 161:1585-8.
14. van der Wal Y., Kooy Y., van Veelan P., Pena S., Mearin L., Molberg O., Lundin KEA, Sollid L., Mutis T., Benckhuijsen WE, Drijfhout JW, Koning F. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1998; 95:10.050-10.054.
- 25 15. Vader W., Kooy Y., Van Veelen P. y col. "The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides". *Gastroenterology* 2002, 122:1729-37
16. Arantz-Hansen H., McAdam SN, Molberg O., y col. "Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadin rich in proline residues". *Gastroenterology* 2002, 123:803-809.

REIVINDICACIONES

1. Un agente seleccionado de:
 - 5 (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
 - (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud.
- 10 2. Un agente según la reivindicación 1 que está restringido a HLA-DQ2.
3. Un agente según la reivindicación 1 que está restringido a HLA-DQ8.
4. Un agente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es un péptido aislado de hasta 50 aminoácidos.
- 15 5. Un agente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 unido a (i) una molécula HLA, o (ii) un fragmento de una molécula HLA capaz de unirse a (a) o (b).
6. Una composición farmacéutica que comprende un agente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6 que comprende un péptido que está restringido a HLA-DQ2 y un segundo péptido que está restringido a HLA-DQ8.
8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6 en la que el péptido comprende un epítipo de trigo.
- 25 9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6 en la que el péptido comprende un epítipo de avena.
10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6 que comprende un péptido que comprende un epítipo de trigo y un péptido que comprende un epítipo de avena.
- 30 11. Una composición para su uso en un método de prevención o tratamiento de la enfermedad celiaca que comprende al menos un agente seleccionado de:
 - 35 (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
 - (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud.
12. Una composición para su uso según la reivindicación 11, comprendiendo dicho método la inducción de inmunotolerancia de un individuo a una proteína de gluten para suprimir la producción de una respuesta de linfocito T o de anticuerpo a un agente como se define en la reivindicación 11.
- 40 13. Un agente seleccionado de:
 - 45 (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
 - (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud; y
 - (c) un análogo de (a) que es un péptido aislado que se une a un anticuerpo, dicho anticuerpo se une a un epítipo que comprende la SEQ ID NO: 200.
- 50 para su uso en un método de tratamiento o prevención de la enfermedad celiaca en un individuo por inducción de inmunotolerancia del individuo para prevenir la producción de tal anticuerpo.
14. Un método de diagnóstico de la enfermedad celiaca, o susceptibilidad a enfermedad celiaca, en un individuo que comprende:
 - 55 (a) poner en contacto una muestra del hospedador, *in vitro*, con al menos un agente seleccionado de:
 - 60 (i) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
 - (ii) un análogo de (i) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce (i) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud; y
 - (b) determinar *in vitro* si los linfocitos T en la muestra reconocen el agente; indicando el reconocimiento por los linfocitos T que el individuo tiene, o es susceptible a, enfermedad celiaca.
- 65 15. Una composición, para su uso en un método de diagnóstico de la enfermedad celiaca, o susceptibilidad a enfermedad celiaca, en un individuo que comprende un agente seleccionado de

- (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
- (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud,

5 comprendiendo dicho método la determinación de si los linfocitos T del individuo reconocen el agente, indicando el reconocimiento por los linfocitos T que el individuo tiene, o es susceptible a, enfermedad celiaca;

16. Un método según la reivindicación 14 en el que el agente comprende (i) o (ii) unido a (a) una molécula HLA, o (b) un fragmento de una molécula HLA capaz de unirse a (i) o (ii).

10 17. Un método según la reivindicación 16 en el que la molécula HLA o fragmento es un complejo que comprende cuatro moléculas de HLA o fragmentos de moléculas de HLA.

15 18. Una composición para su uso según la reivindicación 15 en la que el método comprende administrar el agente a la piel de un individuo y detectar la presencia de inflamación en el sitio de administración, indicando la detección de la inflamación que los linfocitos T del individuo reconocen el agente.

19. Un método según la reivindicación 14 en el que la muestra es muestra de sangre.

20 20. Un método según la reivindicación 19 en el que los linfocitos T no se vuelven a estimular de una manera específica a antígeno *in vitro* antes de dicha determinación.

21. Un método según la reivindicación 20 en el que el reconocimiento del agente por los linfocitos T se determina detectando la secreción de una citoquina de los linfocitos T.

25 22. Un método según la reivindicación 21 en el que la citoquina es IPN-γ.

30 23. Un método según la reivindicación 21 o reivindicación 22 en el que la citoquina se detecta permitiendo que la citoquina se una a un anticuerpo inmovilizado específico a la citoquina y, a continuación, detectando la presencia del complejo anticuerpo/citoquina.

24. Un método según la reivindicación 14 en el que dicha determinación se realiza midiendo si el agente se une al receptor del linfocito T.

35 25. Un método para identificar un análogo de un péptido que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200 comprendiendo dicho método determinar, *in vitro*, si un péptido candidato es reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce un epítipo que comprende la SEQ ID NO: 200, indicando el reconocimiento del péptido candidato que el péptido candidato es un análogo siendo dicho análogo de no más de 50 aminoácidos de longitud.

40 26. Un método de diagnóstico de la enfermedad celiaca, o susceptibilidad a enfermedad celiaca, en un individuo que comprende determinar, *in vitro*, la presencia de un anticuerpo que se une a un epítipo de una secuencia peptídica seleccionada de:

- (i) un péptido que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
- (ii) un análogo peptídico de (i) que es capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce (i) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud;

50 en una muestra del individuo, indicando la presencia del anticuerpo que el individuo tiene, o es susceptible a, enfermedad celiaca.

27. Un método *in vitro* de determinación de si una composición es capaz de causar enfermedad celiaca que comprende determinar si una secuencia de proteína capaz de ser modificada por una transglutaminasa a un péptido que comprende al menos un epítipo que comprende la SEQ ID NO: 200 está presente en la composición, indicando la presencia de la secuencia de proteína que la composición es capaz de causar enfermedad celiaca.

55 28. Un método según la reivindicación 27 en el que dicha determinación se hace poniendo en contacto la composición con un anticuerpo específico para la secuencia de proteína que es capaz de así ser modificada, indicando la unión del anticuerpo a una secuencia de proteína en la composición que la composición es capaz de causar enfermedad celiaca.

60 29. Un kit para llevar a cabo un método según las reivindicaciones 14, 16, 17 o 19 a 24 que comprende un agente seleccionado de

- (a) un péptido aislado que comprende al menos un epítipo que comprende SEQ ID NO: 200; y
- (b) un análogo de (a) que es un péptido aislado capaz de ser reconocido por un receptor de linfocito T que reconoce el péptido de (a) y que no es más de 50 aminoácidos de longitud,

y un medio para detectar el reconocimiento del péptido por el linfocito T.

30. Un kit según la reivindicación 29 en el que los medios para detectar el reconocimiento comprenden un anticuerpo a IFN- γ .

5 31. Un kit según la reivindicación 30 en el que el anticuerpo se inmoviliza sobre un soporte sólido y opcionalmente el kit también comprende un medio para detectar el complejo anticuerpo/IFN- γ .

10 32. Un anticuerpo o fragmento del mismo, específico para SEQ ID NO: 200.

Figura 1

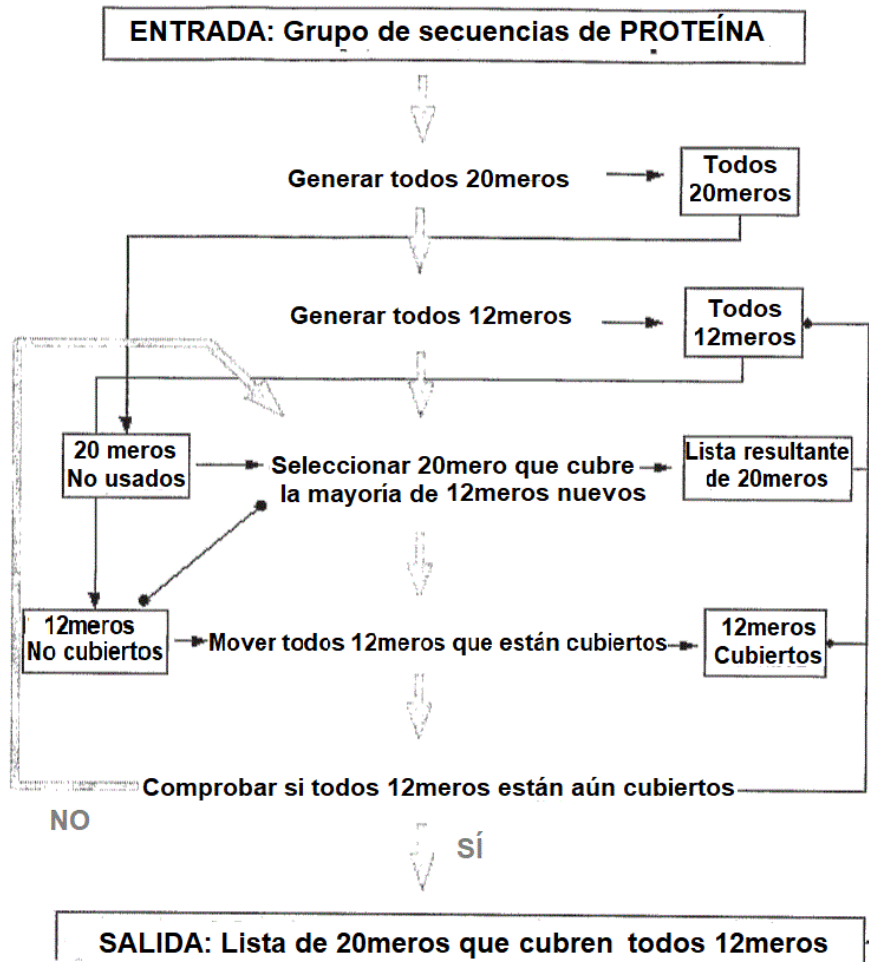


Figura 2

Gliadinas alfa/beta (n=53)	Gliadinas Gamma (n=53)	Gluteninas BPM (n=77)	Gluteninas APM (n=55)	Hordeínas (n=59)	Secalinas (n=14)	Aveninas (n=20)
S07361	AAA34272	AAB35353	A03353	A24095.1	A23277	S29209
P18573	S07398	AAB48474	A24266	A25677	AAB37403	S29208
P04728	PS0094	AAB48475	A30843	AAA32942	AAB37404	S29207
P04727	P21292	AAB48476	AAA62315	AAA32943	AAB37405	S06455
P04726	P08453	AAB48477	AAB02788	AAA32944	AAB37406	P80356
P04725	P08079	AAB48478	AAB23624	AAA32955	AAB37407	P27919
P04724	P06659	AAB48479	AAB23625	AAA32967	AAB58403	P14812
P04723	P04730	BAA22613	AAB23626	AAA92333	AAG35598	JQ1048
P04722	P04729	BAA22614	AAB23627	AAB28161	CAA26449	JQ1047
P04721	JS0402	BAA23162	AAB23628	AAB71678	S18235	JQ1046
P02863	JA0153	BAB78737	AAD32223	AAB71679	S18236	JG0015
EEWTA	EEWTG	BAB78738	AAF23506	B24095	S70327	B36433
E22364	CAC94871	BAB78739	AAF23507	B25677	S70328	AAB32025
D22364	CAC94870	BAB78740	B30843	BAA11642	S70329	AAB23365
CAB76964	CAC94869	BAB78741	CAA26847	CAA25509		AAA32716
CAB76963	CAC94868	BAB78742	CAA27052	CAA25912		AAA32715
CAB76962	CAC11089	BAB78743	CAA31395	CAA25913		AAA32714
CAB76961	CAC11088	BAB78744	CAA31396	CAA25914		AAA32713
CAB76960	CAC11087	BAB78745	CAA32115	CAA26889		1502200A
CAB76959	CAC11080	BAB78746	CAA43331	CAA31861		1411172A
CAB76958	CAC11079	BAB78747	CAA43361	CAA37729		
CAB76957	CAC11078	BAB78748	CAA59340	CAA42642		
CAB76956	CAC11065	BAB78749	CAC40684	CAA48209		
CAB76955	CAC11064	BAB78750	CAC40685	CAA51204		
CAB76954	CAC11057	BAB78751	CAC40686	CAA59104		
CAA35238	CAC11056	BAB78752	CAC40687	CAA60681		
CAA26385	CAC11055	BAB78753	CAC83002	P02864		
CAA26384	CAB75404	BAB78754	CAC83003	P06470		
CAA26383	BAA11251	BAB78755	CAC83018	P06471		
CAA10257	AAN32705	BAB78756	CAC84118	P06472		
C22364	AAK84880	BAB78757	CAC84119	P17990		
BAA12318	AAK84780	BAB78758	CAC84120	P17991		
B22364	AAK84779	BAB78759	CAC84121	P17992		
AAN32704	AAK84778	BAB78760	CAC84122	P80198		
AAB23109	AAK84777	BAB78761	EEWTHW	S07189		
AAB23108	AAK84776	BAB78762	JC2099	S07365		
AAA96525	AAK84775	BAB78763	JC4966	S07975		
AAA96524	AAK84774	BAB78764	JN0689	S07976		
AAA96523	AAK84773	CAA30570	JN0690	S08312		
AAA96522	AAK84772	CAA31685	P02861	S18350		
AAA96276	AAF42989	CAA59313	P02862	S20519		
AAA34283	AAD30556	CAA59338	P08488	S52390.1		
AAA34282	AAD30440	CAA59339	P08489	T04369		
AAA34281	AAB31090	CAA59340	P10387	T04473		
AAA34280	AAA34289	CAA76890	P10388	T04474		
AAA34279	AAA34288	EEWT1	S02262	T05718		
AAA34278	AAA34287	P10385	S04832	T05737		
AAA34277	AAA34286	P10386	S15720	T06211		
AAA34276	AAA34285	P16315	S18733	1103203A		

ES 2 648 792 T3

AAA17741	AAA34274	S01992	S29176	1103203B		
A27319	1802407A	S04325	S29177	1103203C		
A22364	1507333A	S57645	S29178	1210226A		
1307187B	1209306A	S57654	S29179	1307151A		
	Gliadinas omega (n=2)					
	A59156	S57655	AAN78346	1307151B		
	AAG17702	S57656	AAO74630	1604464A		
		T05910		A24095.2		
		T05923		AAP31051		
		T06505.1		CAA48209.2		
		T06505.2		S52390.2		
		T06506				
		T06508				
		T06980				
		T06981				
		T06982				
		AAP44992				
		AAP44991				
		AAP44989				
		AAO53259				
		CAD58622				
		CAD58619				
		CAD58621				
		A03353				
		AAO53264				
		AAO53265				
		AAO53266				
		AAO53267				
		CAA76890				
TOTAL:	Todas gliadinas					
20meros	721	645	786	416	155	199
12meros	4465	3945	4799	2672	957	1279
9meros	3739	3164	3630	2413	811	1207

FIGURA 3

Figura 3A

Etapas M:

$$\begin{aligned} \frac{dQ(\theta, \theta^{(c)})}{dp_j^{(c)}} = 0 &\quad \rightarrow p_j^{(c+1)} = \frac{\sum_i \hat{z}_{ij}^{(c)}}{n} \\ \frac{dQ(\theta, \theta^{(c)})}{d\alpha_i^{(c)}} = 0 &\quad \rightarrow \alpha_i^{(c+1)} = \frac{\sum_j [\hat{z}_{ij}^{(c)} y_{ij} + (1 - \hat{z}_{ij}^{(c)}) y_{ij}]}{\sum_j [\lambda_j^{(c)} \hat{z}_{ij}^{(c)} + \lambda_0^{(c)} (1 - \hat{z}_{ij}^{(c)})]} \\ \frac{dQ(\theta, \theta^{(c)})}{d\lambda_j^{(c)}} = 0 &\quad \rightarrow \lambda_j^{(c+1)} = \frac{\sum_i \hat{z}_{ij}^{(c)} y_{ij}}{\sum_i \alpha_i^{(c)} \hat{z}_{ij}^{(c)}} \\ \frac{dQ(\theta, \theta^{(c)})}{d\lambda_0^{(c)}} = 0 &\quad \rightarrow \lambda_0^{(c+1)} = \frac{\sum_{ij} (1 - \hat{z}_{ij}^{(c)}) y_{ij}}{\sum_{ij} \alpha_i^{(c)} (1 - \hat{z}_{ij}^{(c)})} \end{aligned}$$

Etapas E:

$$\hat{z}_{ij}^{(c+1)} = E(z_{ij} | y_{ij}) = pr(z_{ij} = 1 | y_{ij}) = \frac{p_j^{(c)} pr(y_{ij} | \alpha_i \lambda_j^{(c)})}{p_j^{(c)} pr(y_{ij} | \alpha_i \lambda_j^{(c)}) + (1 - p_j^{(c)}) pr(y_{ij} | \alpha_i \lambda_0^{(c)})}$$

Calcular:

$$\begin{aligned} Q(\theta, \theta^{(c)}) = \sum_{ij} \{ &\hat{z}_{ij}^{(c)} \log p_j + (1 - \hat{z}_{ij}^{(c)}) \log(1 - p_j) + y_{ij} \hat{z}_{ij}^{(c)} \log(\alpha_i \lambda_j) \\ &+ y_{ij} (1 - \hat{z}_{ij}^{(c)}) \log(\alpha_i \lambda_0) - \hat{z}_{ij}^{(c)} \alpha_i \lambda_j - (1 - \hat{z}_{ij}^{(c)}) \alpha_i \lambda_0 \} \end{aligned}$$

Figura 3B

Paciente: $j = 1 \dots 29$
 Péptido: $j = 1 \dots 652$
 Placa: $m = 1 \dots 7$

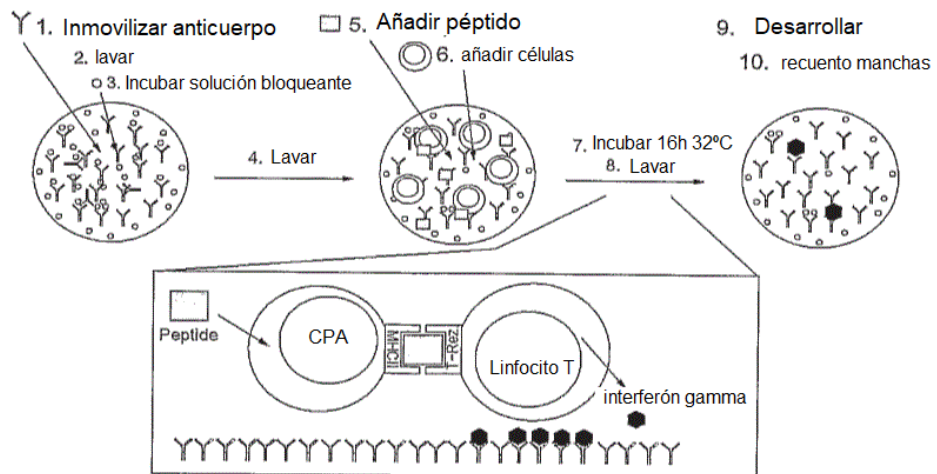
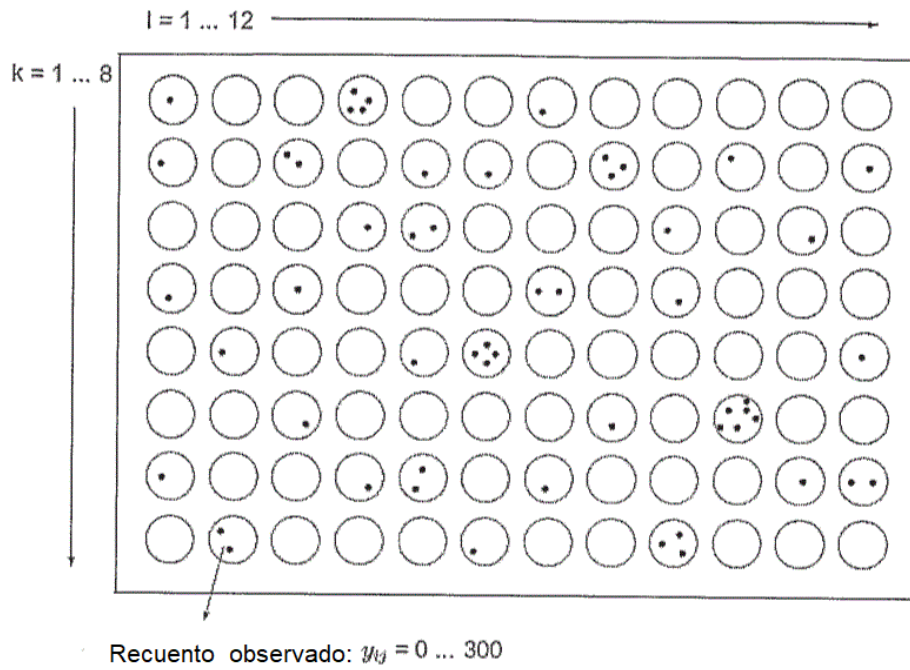


Figura 4

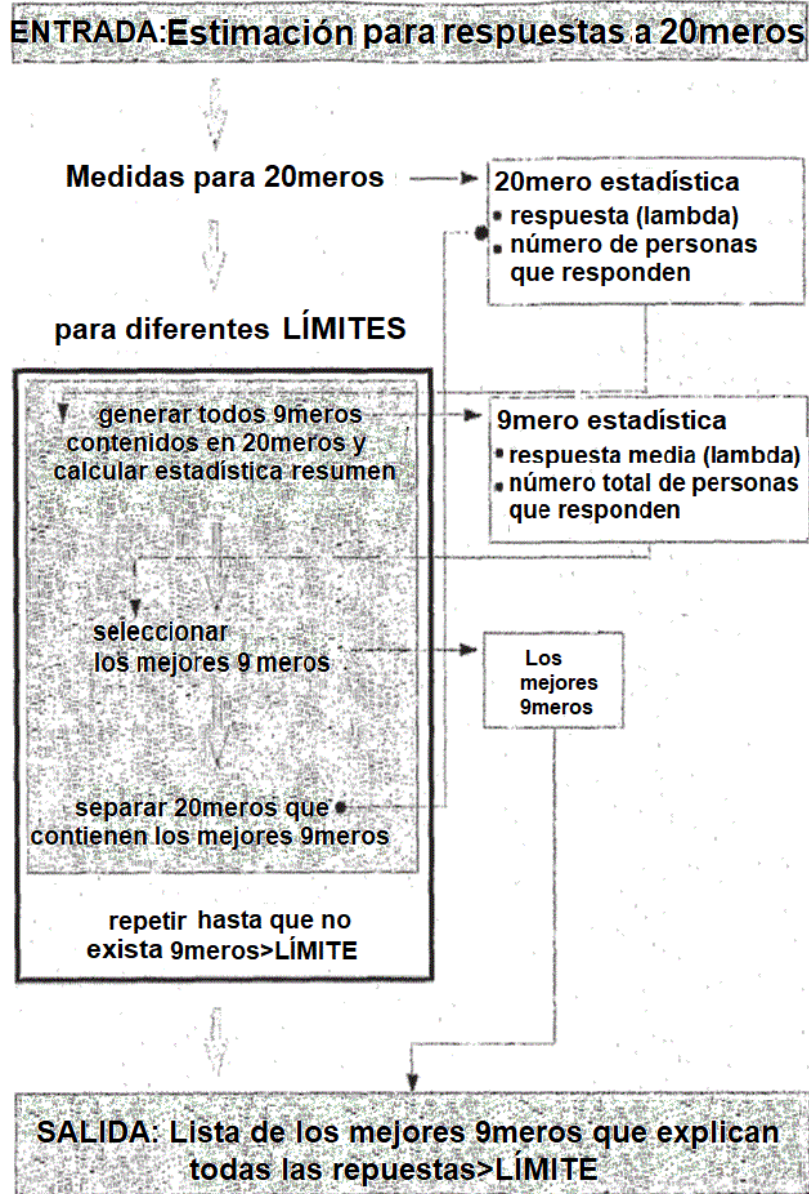


Figura 5

Grupo	Consenso	SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:
1	gEIpFpEpE	1	gqlpypape lypqpg	200
			gqlpypapq lypqpg	201
2	EIpFpEpEI	2	ylqlqpfqqlpypqql p	202
			pqpfpp qlpypqql pypq	203
			pymqlqpfqqlpypqql	204
			qlqpfqqlpypqql	205
			gqlpypape lypqpg	206
			gqlpypqql pypqpg	207
			pqpfpp qlpypqql pypq	208
			mqlqpfqqlpypqql py	209
			qlqpfqqlpypqql	210
			pqlpypqql pypqqlpyp	211
			pqlpypqql pypqqlpyp	212
			lqpfqqlpypqql pypf	213
			lqlqpfqqlpypqql py	214
			pqpfpp qlpypqql pypq	215
3	EEpFpFEpE	3	qpfqqlpypqql pypq	216
			pqqqqqpfqqlpypqql	217
			qpfqqlpypqql pypq	218
			qpfqqlpypqql pypq	219
5	FpEpEEpIp	4	qpfqqlpypqql pypq	220
			pqqqqqpfqqlpypqql	221
			pqqqqqpfqqlpypqql	222
			gqqlpypqql pypq	223
			gqqlpypqql pypq	224
			pqqqqqpfqqlpypqql	225
6	FpEpEEpFp	5	qpfqqlpypqql pypq	226
			pqqqqqpfqqlpypqql	227
			pqqqqqpfqqlpypqql	228
			qpfqqlpypqql pypq	229
			gqqlpypqql pypq	230
			gqqlpypqql pypq	231
			pqqqqqpfqqlpypqql	232
			qpfqqlpypqql pypq	233
			qpfqqlpypqql pypq	234
			qpfqqlpypqql pypq	235
			qpfqqlpypqql pypq	236
			qpfqqlpypqql pypq	237
7	EpEIpFpEp	6	ylqlqpfqqlpypqql p	238
			pqpfpp qlpypqql pypq	239
			pymqlqpfqqlpypqql	240
			qlqpfqqlpypqql	241
			gqlpypape lypqpg	242
			gqlpypape lypqpg	243
			lqlqpfqqlpypqql pypq	244
			qlqpfqqlpypqql	245

			gqlpypapqlpypapq	246
			papfppqlpypapqlpypapq	247
			lqlapfpaqqlpypapqapfr	248
			lqlapfpaqelpypapelpypapelpypapapf	249
			mqlapfpaqqlpypapqlpy	250
			qlapfpaqelpfpaqg	251
			qlapfpaqelpypapql	252
			pqlpypapqlpypapqlpyp	253
			qlapfpaqqlpypapqap	254
			qlapfpaqqlpypapqg	255
			pqlpypapqlpypapqapfrp	256
			lqapfpaqelpypapelpypf	257
			lqlapfpaqqlpypapqlpy	258
			qlapfpaqqlpfaqg	259
			papfppqlpypapqlpypap	260
			ypaqqlpypapqapfrpqqsy	261
			gsgaqelpypapqsg	262
			lqlapfpaqqlpypapqlpypapqlpypapapf	263
8	EEpFpEpEI	7	qapqapfpaqlpfpqqseq	264
			fpqapqapfpaqlpfpqqss	265
9	pEEpFSEEG	8	gqapfpaqpaqfsqqg	266
			gqapfpaqpaqfsqqg	267
10	gFpEpEIpF	9	gsqfpaqelpypqsg	268
11	pEEEpEEpF	10	apqlpfpqapqapqapfpq	269
			gqapqapqapfpqag	270
			gqapqapqapfpqag	271
12	IEEpEEpFp	11	lqapqapfpqapqalpaqg	272
			lqapqapfpqapqalpaqg	273
			apqapfpqlqapqapfpqg	274
			pfpqlqapqapfpqapqalp	275
			gfpqlqapqapfpqag	276
			gfpqlqapqapfpqag	277
13	pEpEpFIpE	12	lqfpaqapflpqlpypapq	278
			lqlapfpaqapflpqlpypq	279
14	EEISpcmdI	13	lqqilqqaltpcmdvvlqgh	280
			ilqqilqqaltpcmdvvlqg	281
15	FEEEpFpEE	14	qspqqsfsyqqapfpqapyp	282
			yqqapfpqapypqapypsqg	283
			pqqsfyqqapfpqapypqg	284
16	EpFpEpEIp	15	ylqlapfpaqqlpypapqlp	285
			pymqlapfpaqqlpypapql	286
			qlapfpaqqlpypapql	287
			qlapfpaqelpypqag	288
			lqlapfpaqqlpypqapfr	289
			qlapfpaqelpypqap	290
			lqlapfpaqqlpypqapfr	291
			lqlapfpaqelpypaqelpypapelpypapapf	292
			mqlapfpaqqlpypapqlpy	293
			qlapfpaqelpfpaqg	294

			ql qffpqpelp yppqql	295
			ql qffpqpqlp yppqp	296
			gl qffpqpqlp yppqg	297
			l qffpqpelp yppqelp yppf	298
			qqpqqffpqpqlp fpqqseq	299
			lql qffpqpqlp yppqqlpy	300
			fpqqpqqffpqpqlp fpqqg	301
			gl qffpqpqlp fpqqg	302
			gl qffpqpelp ylpqg	303
			pylql qffpqpqlp yspqp	304
			gl qffpqpelp yspqg	305
			lql qffpqpqlp ylpqpfr	306
			lql qffpqpqlp ylpqpfr	307
			lql qffpqpqlp yspqpfr	308
			gsg qffpqpelp gsg	309
			lql qffpqpqlp yppqqlp yppqqlp yppqppf	310
			gl qffpqpqlp yspqg	311
			qffpqpqlp yspqqfrpqq	312
			lql qffpqpqlp yspqqfr	313
			gl qffpqpqlp ylpqg	314
			qfqsqlylql qffpqpqlp	315
			pffsqppymql qffpqpqlp	316
			pffsqlylql qffpqpqlp	317
			pffsqppylql qffpqpqlp	318
			pffsqppylql qffpqpqlp	319
17	pEEpEEEEp	16	ppqpf ppqpqqqffp ppqqq	320
			qqpf ppqpqqqffp ppq	321
			qqppqpf ppqpqqqffp ppq	322
			qqpf ppqpqqqffp ppq	323
			gf ppqpqqqffp ppqqq	324
			ppqpf ppqpqqqffp ppqqq	325
			gf ppqpqqqffp ppqqq	326
			qqpf ppqpqqqffp ppq	327
			qqppqpf ppqpqqqffp ppq	328
			ppqqpqqf ppqpqqqffp ppq	329
			gf ppqpqqqffp ppqqq	330
18	pFSEEEEEpI	17	qqppfsqqqqpv lpqg	331
			lqqspfsqqqqpv lpqqqv	332
			pfsqqqqppfsqqqqpv lpq	333
			qqqpilsqqppfsqqqqpv l	334
			qqpfsqqqqpv lpqqspfsq	335
			qqqvlpqqppfsqqqqpv ll	336
			qqqpilsqqppfsqqqqpv l	337
			qqqpfsqqqqpv lpqqppf	338
			pfsqqqqppfsqqqqpv lpqg	339
			qqqpilpqlpfsqqqqpv lp	340
			qqppfsqqqqpv lppqqspf	341
			qqppfsqqqqpv lpqg	342
			qspfsqqqqpv lpqqqvii	343
			qpffsqqqqpv lpqqspfsq	344
			qqqpfsqqqqpv ipqqpsf	345

			lppfsqqilppfsqqqqpv lp	346
			qqqqppfsqqqqpv lpqqsp	347
			sqqqpilsqqppfsqqqqpv	348
			pfssqqqqpv llqqqipfvhp	349
19	pEEpSpIEp	18	ftqppqptpiqppqfpqqp	350
			pftqppqptpiqppqfpqq	351
			fpeqsqqpftqppqptpiqpp	352
20	EpEEpIpIE	19	pqqppqppfpqqppipvqpp	353
			pqqppqppfpqqppipvqpp	354
			gqqppfpqqppipvqpp	355
			gqqppfpqqppipvqpp	356
			pqqppqppfpqqppipvqpp	357
			pqqppipvqppqqsfppqqsg	358
			qqppipvqppqqsfppqqsg	359
21	EpEEpEIpF	20	qqppfpqqppqilpf pqqppq	360
			qqppqppfpqqppqilpf p	361
			qqppqppfpqqppqilpf pqq	362
			qqppqppfpqqppqilpf pqq	363
			pqqppqilpf pqqppqppfpq	364
			pqqppfpqqppqilpf pqqpp	365
			gqqppfpqqppqilpf g	366
			qqppfpqqppqilpf pqqppq	367
			gqqppfpqqppqilpf g	368
			gfpqqppelilpf pqqpp	369
			gfpqqppqilpf pqqpp	370
22	EpEIpFpEg	21	gsppqqelppypqsg	371
23	FpEpEIpFg	22	gsppfpqqelppypqsg	372
24	pEEpFcEEg	23	gqqppfpqqppfcqqg	373
			gqqppfpqqppfcqqg	374
25	FpEpEEEEp	24	gf fpqqppqefpqqpp	375
			gqqppfpqqppqefpqqpp	376
			sqqppqppfpqqppqefpqqpp	377
			gqqppfpqqppqefpqqpp	378
			sqqppqppfpqqppqefpqqpp	379
			qppfpqqppqefpqqppqqsf	380
			gffpqqppqefpqqpp	381
			sqqppqppfpqqppqefpqqpp	382
			gffpqqppqefpqqpp	383
			gqqppfpqqppqefpqqpp	384
26	gEpSpIEpE	25	gqptpiqqppfpqqg	385
			gqptpiqqppfpqqg	386
27	FIpEIpFpE	26	lqppfpqppflpqlppypqpp	387
			flpqlppypqppsfppqppyp	388
			gqppflpqlppypqpp	389
			pqpflpqlppypqppsfppqpp	390
			pqpflpqlppypqppsfppqpp	391
			gqppflpqlppypqpp	392
			lqlqppfpqppflpqlppypq	393
28	FIEEEcSRI	27	svlqqilnqckvflqqqshv	394
			kvflqqqshvamsqrlarp	395
29	pFpEpEEpF	28	qppfpqqppfpwqqppfpq	396

			pppppppppppppppppppp	397
			pppppppppppppppppppp	398
			pppppppppppppppppppp	399
			pppppppppppppppppppp	400
			pppppppppppppppppppp	401
			pppppppppppppppppppp	402
			pppppppppppppppppppp	403
			pppppppppppppppppppp	404
			pppppppppppppppppppp	405
			pppppppppppppppppppp	406
			pppppppppppppppppppp	407
			pppppppppppppppppppp	408
			pppppppppppppppppppp	409
			pppppppppppppppppppp	410
			pppppppppppppppppppp	411
			pppppppppppppppppppp	412
			pppppppppppppppppppp	413
			pppppppppppppppppppp	414
			pppppppppppppppppppp	415
			pppppppppppppppppppp	416
			pppppppppppppppppppp	417
			pppppppppppppppppppp	418
			pppppppppppppppppppp	419
30	FLEpEEpFp	29	pppppppppppppppppppp	420
			pppppppppppppppppppp	421
			pppppppppppppppppppp	422
			pppppppppppppppppppp	423
			pppppppppppppppppppp	424
			pppppppppppppppppppp	425
			pppppppppppppppppppp	426
			pppppppppppppppppppp	427
			pppppppppppppppppppp	428
			pppppppppppppppppppp	429
31	pEEEEIaRg	30	pppppppppppppppppppp	430
			pppppppppppppppppppp	431
32	EpEEpFpEp	31	pppppppppppppppppppp	432
			pppppppppppppppppppp	433
			pppppppppppppppppppp	434
			pppppppppppppppppppp	435
			pppppppppppppppppppp	436
			pppppppppppppppppppp	437
			pppppppppppppppppppp	438
			pppppppppppppppppppp	439
			pppppppppppppppppppp	440
			pppppppppppppppppppp	441
			pppppppppppppppppppp	442
			pppppppppppppppppppp	443
			pppppppppppppppppppp	444
			pppppppppppppppppppp	445
			pppppppppppppppppppp	446
			pppppppppppppppppppp	447

			q1pfpqapqapfpapqapq	448
			hqpqqqfpqtqapqapfpap	449
			pqtqapqapfpapqqtfpq	450
			apqapqapfpapqapq1pfp	451
			pqqpfpqapqapqapfpapq	452
			qapqapfpapqapq1pfpq	453
			sqapqapfpapqapqqsfpq	454
			qqqapfpapqapqapfpapq	455
			qapqapfpapqapq1pfpq	456
			pqapqapfpapqapq1pfpq	457
			lqapqapfpapqapq1pfpq	458
			apqapfpqsqapqapfpapq	459
			apqapfpqlqapqapfpapq	460
			apqapfpapqapfpwqp	461
			skapqapfpapqapqqsfpq	462
			sqapqapfpapqapqfpapq	463
			apqapfpapqapfpwqp	464
			pfpqlqapqapfpapqapq1p	465
			qskapqapfpapqapqqsfp	466
			f1apqapfpqapqapfpap	467
			qqqapqfpapqapqapfpap	468
			apqapfpqsqapqapfpapq	469
			apqapfpqskapqapfpapq	470
			p1apqapfpqapqapfpapq	471
			qqfpqtqapqapfpapqqt f	472
			qqqapfpqskapqapfpap	473
33	pFpIEpEEp	32	pqqpqqpfp1apqapfpqap	474
			qqpfp1apqapfpqap	475
			pqqpqqpfp1apqapfpqap	476
			qqpfp1apqapfpqap	477
			pqq1qapfp1apqapfpqap	478
			pqqpqqpfp1apqapfpqap	479
			seqiipqqlqapfp1apqap	480
34	EpEEaFpEp	33	qqt fph apqapfpapq	481
			qt fph apqapfpapqqt fph	482
			qqt fph apqapfpapq	483
			pqqt fph apqapfpapqqt f	484
35	pEFpSEIpF	34	ppqapypqapqfpaqlpylql	485
			qqpypqapqfpaqlpylqlap	486
36	pFpEpEEEEI	35	lqqpqqpfpapqapq1pqq	487
			qqqpfpapqapq1pqq	488
			lqqpqqpfpapqapq1pqq	489
			pfpqlqapqapfpapqapq1p	490
			qqqpfpapqapq1pqq	491
			apfpapqapq1pqqapqqs f	492
37	ppEIpFpEp	36	pqpfppq1pypapq1pypap	493
			pqpfppq1pypapq1pypap	494
			apfppq1pypapqapfripq	495
			pqpfppq1pypapq1pypap	496
			pqpfppq1pypapqapfripq	497
			pqpfppq1pypapppfripq	498

			pqpfpqqlpypqapqsfppqg	499
			gqpqpfppelpypqapq	500
			gqpqpfppqlpypqapq	501
			pfpqapqfpqqlpypqapppf	502
			gsgppelpypqapqsg	503
			pfpqapqfpqqlpypqapqsf	504
			pqpfpqqlpypqapppfspqg	505
38	mEIEpFpEp	37	pymqlqpfqapqlpypqapql	506
			mqlqpfqapqlpypqapqlp	507
			mqlqpfqapqpfppqlpypq	508
			pfpqapqymqlqpfqapqpf	509
			pfpqapqymqlqpfqapqpl	510
			pfpqapqymqlqpfqapqpf	511
39	EESScRImE	38	pqrlarsqmwqqsschvmqg	512
			qqlarsqmlqqsschvmqgg	513
			pqrlarsqmwqqsschvmqg	514
			rlarsqmlqqsschvmqggc	515
			rpqmwqqsschvmqggccqg	516
			mwqqsschvmqggccqqlqg	517
			sqmlqqsschvmqggccqql	518
			qqsschvmqggccqqlqqip	519
			qqsschvmqggccqqlqqip	520
			rlarsqmwqqsschvmqggc	521
			arsqmlqqsschvmqggccq	522
40	EEFSEpEEE	39	gqgqfsqpeqefpqpqg	523
			gqgqfsqppqgfpqpqg	524
			gqgqfsqpeqefpqpqg	525
			sqqpqgqfsqppqgfpqpqg	526
			sqqpqgqfsqppqgfpqpqg	527
			qgqfsqpeqefpqpqg	528
			qsqqpqgqfsqppqgfpqpqg	529
			qpqgqfsqppqgfpqpqg	530
41	pEEEFpEpE	40	gffpqppeqefpqpqg	531
			sqqpqgfpqpqgfpqpqg	532
			sqqpqgfpqpqgfpqpqg	533
			ppqpfpqpqgfpqpqg	534
			ppqpfpqpqgfpqpqg	535
			qpfqpqpqpfpqpqg	536
			qpqpqpfpqpqgfpqpqg	537
			gffpqppeqefpqpqg	538
			sqqpqgfpqpqgfpqpqg	539
			gffpqpqpfpqpqg	540
			qpqpqpfpqpqgfpqpqg	541
			gfpqppeqefpqpqg	542
			ppqpfpqpqgfpqpqg	543
			gffsqpqppeqefpqpqg	544
			ppqpqpfpqpqgfpqpqg	545
			gfpqpqppeqefpqpqg	546
			sqqpqgqfsqppqgfpqpqg	547
			sqqpqgqfsqppqgfpqpqg	548
			qgqfsqpeqefpqpqg	549

			qsqqppqqsqqppqfqqp	550
			ppppffqqpppppppppp	551
			qqqqfsqqpppppppppp	552
			pppppppppppppppppp	553
			pppppppppppppppppp	554
			gffsqpppppppppppp	555
			tfphqpppppppppppp	556
			qtffhqpppppppppppp	557
			gpppppppppppppppp	558
			sppppppppppppppp	559
			qtcphqpppppppppp	560
42	pIpEIEpRn	41	pvpqlqpknpssqqppqevp	561
			avrppvpqlqpknpssqqppq	562
43	SScISgIER	42	metscisglerpwqqqplpp	563
44	FEEEpIppE	43	pwqqqplppqqsfsqqppfs	564
			pwqqqplppqqsfsqqppfs	565
			erpwqqqplppqhtlfpqqq	566
			etrcipglerpwqqqplppq	567
			shipglerpwqqqplppqqt	568
			mcipglerpwqqqplppq	569
			scisglerpwqqqplppqqs	570
			pwqqqplppqqtlfppqqpf	571
			erpwqqqplppqqsfsqqpp	572
			scisglerpwqqqplppqqs	573
			rpwqqqplppqqtlfppqqpf	574
			pwqqqplppqhtlfpqqqpf	575
			ekpwqqqplppqqsfsqqpp	576
			pwqqqplppqqsfsqqppfs	577
			etscipglerpwqqqplppq	578
45	EpIpEEpSF	44	sqpppfsqqqqqplppqpsf	579
			qplppqpsfsqqppfsqqq	580
			qqqqqplppqpsfsqqppf	581
			ppfsqqqqqplppqpsfsqq	582
			qplppqpsfsqqppfsqqq	583
			sqpppfsqqqqqplppqpsf	584
			qqqqqplppqpsfsppg	585
			qqqqqplppqpsfsqqppf	586
			qqqqqplppqpsfsppg	587
46	IIFSSIEE	45	qqsryeairaiyvstlqeq	588
			aivystlqeqqqvqgsiqt	589
47	EpIISEEpp	46	qqqppilppqpsfsqqppvl	590
			fsqqpppsqqqppilppqps	591
			fsqqpppsqqqppilppqps	592
			qqqppilppqpsfsqqppvl	593
			qqpppsqqqppilppqpsfs	594
			ppppppilppqpsfsqqppv	595
			qqpppsqqqppilppqpsfs	596
48	EgIEIIRpI	47	vmqqeqqqgqilrplfqlv	597
			qqqqgqilrplfqlvqqg	598
49	pFSSIIaqI	48	csiikapfssvvagiggqyr	599
			csiikapfssvvagiggq	600

50	FcSSSIapI	49	yippycesttiapvgifgtn	601
			vyippycesttiapvgifgtn	602
51	RIamSERIA	50	qqcshvamsqrllarsqmwqq	603
			kvflqqqcshvamsqrllarp	604
			qcshvamsqrllarpqmwqq	605
52	EpESFppEE	51	flpqlpypqpqsfppqpyp	606
			pqpflpqlpypqpqsfppqq	607
			pqpflpqlpypqpqsfppqq	608
			pqpfpqpqpypqpqsfppqq	609
			gqpqsfppqpypqqq	610
			lpqlpypqpqsfppqpypq	611
			gqpqsfppqpypqqq	612
53	siilqEggq	52	rydaicaitysiilqeqqq	613
			airaiysiilqeqqqgfvq	614
			iraiysiilqeqqqgfvqp	615
			iiysiilqeqqqgggsvesq	616
			airaiysiilqeqqqvqgs	617
			aiysiilqeqqqgfvqpqq	618
			ryeairaiysiilqeqqqv	619
			iraitysiilqeqqqgfvqa	620
			vysiilqgggggggggggg	621
			aiysiilqeqqqvqgsiqs	622
			siraiysiilqgggggggg	623
			aiysiilqeqqqvqgsiqs	624
			aiifsiilqeqqqgfvqpqq	625
			siilqeqqqgggsvesqeqq	626
			rhesiraiysiilqgggg	627
			yysiilqeqqqgfvqpqqqp	628
			airaiysiilqeqqqvqgs	629
			yeairaiysiilqeqqqgf	630
54	ESEEpEEpF	53	hqpqqqfpqtqppqpfpqp	631
			pqtqppqpfpqpqqfppq	632
			qpfpqtqppqpfpqpqq	633
			qtqppqpfpqpqpqpfpqt	634
			qpqpfpqpqpqpfpqpqp	635
			gfpqtqppqpfpqpqq	636
			gfpqpqpqpfpqpqq	637
			ppqpqpfpqtqppqpfpqp	638
			qpfpqtqppqpfpqpqp	639
			qpqpfpqpqpqpfpqpqp	640
			qpqpfpqtqppqpfpqpqp	641
			pqtqppqpfpqpqpqpfp	642
			qfpqtqppqpfpqpqpft	643
			gqpfpqpqpqpfpqpqp	644
			qpfpqtqppqpfpqpqpqp	645
			gfpqpqpqpfpqpqpqp	646
			qpfpqtqppqpfpqpqpqp	647
			qpfpqtqppqpfpqpqpqp	648
			gfpqtqppqpfpqpqpqp	649
			gqpfpqpqpqpfpqpqp	650
			gqpfpqtqppqpfpqpqp	651

			gqqpfpqteqppqpf g	652
			pfpqtqqppqpf pqlqqppq	653
55	EIEEpEEpI	54	qpfpqlqqppqpl pppqqp	654
			gfpqlqqpeqpl pqqg	655
			qqqqpfpqlqqppqpl pppq	656
			gfpqlqqppqpl pqqg	657
56	IpEEpEEpF	55	gqp ipqqpeqpf plqg	658
			fpelqqp ipqqppqpf plqp	659
			fpelqqp ipqqppqpf plqp	660
			gqp ipqqppqpf plqg	661
			gqlqqp ipqqppqpf g	662
			gqlqqp ipqqppqpf g	663
57	FpEEpEEpF	56	qqpfpqqppqpf pppqqppip	664
			fpqqppqpf pppqplpfpqqs	665
			qqflqqppfpqqppqppq	666
			plqqppfpqqppqpf pppq	667
			qlpfpqqppqpf pppqqppq	668
			tqqppfpqqppqpf pqtg	669
			qtqqppfpqqppqpf pqt	670
			ppqqppqlpfpqqppqpf p	671
			qqpfpqqppqpf pqtqqppq	672
			qqpypqqppqpf pqtqqppq	673
			qqpfpqqpeqpf pqqg	674
			fpelqqppfpqqppqpf pqp	675
			ppqqpflqqppfpqqppqpf	676
			plqqppfpqqppqpf pqqp	677
			gqpqqpfpqqppqpf g	678
			qqpypqqpeqpf pqqg	679
			qqpfpqqppqpf pqqg	680
			ypqqpfpqqppqpf pqqppf	681
			qqtfpqqppqlpfpqqppqpf	682
			ppqqpflqqppfpqqppqppq	683
			plqqppfpqqppqpf pppq	684
			gqpqqpfpqqppqpf g	685
			xqpfpqqppqppq pppqqpf	686
			qqpypqqppqpf pqqg	687
			qqpfpqqppqppq pppqqpf	688
			ppqqpfpqqppqpf pqtqqp	689
			fpqqppqppq pppqqppfpqt	690
			fpqqpprqpypqqppqpf pqt	691
			pfpqqpeqppq pppq	692
			pfpqqppqpf pppqqspq	693
			gqpqlpfpqqppqpf g	694
			gqpqlpfpqqppqpf g	695
			ppppqqspfpqqppqppq	696
			ppppqqspfpqqppqppq	697
			lppqqpfpqqppqppq	698
			ppqqpflqqppfpqqppqppq	699
			pxqpfpqqppqppq pppqqp	700
58	SpIEpEEpF	57	gqp tpiqqpeqpf pqqg	701
			ftqqpp tpiqqppqpf pqqp	702

			pftqppq tpiqqqpf pqq	703
			tpiqqqpf pqqppppppf	704
			qqp tpiqqqpf pqqq	705
59	pFSEEpEEI	58	qqpfsqqpqqi fpqqq	706
			qqpfsqqpqqi fpqpqt fp	707
			qqqqpfpqpqqpfsqqpqqi	708
			hqpfsqqpqqi fpqpqt fp	709
			qqpfsqqpqqi fpqqq	710
			pflqphqpfqqpqqi fpqp	711
			qqppqpfqqpqqi fg	712
			qqqpflqphqpfqqpqqi f	713
			qqppfsqqpqqi fpqpqt	714
			qqppqpfqqpqqi fg	715
60	gEEIFpEpE	59	qqqifpqpqt fphqq	716
			qqqifpqpqt fphqq	717
61	EpEEpEEpF	60	pqqppppppf pqpqpfpw	718
			pqqppppppf pqpqpfpw	719
			pqpfp pqpqpqpfp pqpqq	720
			pqqqfp pqpqpqpfp pqpqq	721
			qqppppppf pqpqpqlpfp	722
			pqpfp pqpqpqpfp pqpqq	723
			qqqqpfp pqpqpqpfp pqpqq	724
			tpiqqqppfp pqpqpqpfp	725
			piqqppppfp pqpqpqpfp	726
			qqfp pqpqpqpfp pqpqpqq	727
			qqqpfp pqpqpqpfp g	728
			qqppppfp pqpqpqpfp pqp	729
			lqqpppplp pqpqpqpfp pq	730
			gfp pqpqpqpfp pqqq	731
			gfp pqpqpqpfp pqqq	732
			qqpfp pqpqpqpfp pqlqqp	733
			pqqqfp pqpqpqpfp pqpqq	734
			qqppppppf pqqppliqpy	735
			pqpfp pqpqpqpfp pqlqq	736
			qqqpfp pqpqpqpfp g	737
			qqpqlp pqpqpqpfp g	738
			pqpqpqpqpfp pqqppliqp	739
			qqpfp pqpqpqpfp pqsqqp	740
			tfpqpqpqpfp pqpqpqpfp	741
			qqqqfp pqpqpqpfp g	742
			qqpqlp pqpqpqpfp g	743
			tfpqpqpqpfp pqpqpqpfp	744
			qqpqlp pqpqpqpfp pqsqqp	745
			qqqqfp pqpqpqpfp g	746
			qqvp pqpqpqpfp lqpqpfp	747
			qqpqlp pqpqpqpfp pqsqqp	748
			qqvp pqpqpqpfp lqpqpfp	749
62	FpEEpEEpI	61	pqqqqlp fpqpqpql pqpqq	750
			qaqlp fpqpqpql pqpqpqp	751
63	pSSEppFp	62	qqpfpqpqpqpqpqpqpfp q	752
			qqqqppppppfp qqhqqfp	753

			ppfsqqqpsqqppfp qqh	754
64	FpEEpEIpF	63	pqqpfpqqqt fpqqqlpf	755
			fpqqqt fpqqqlpf pqqp	756
			qqt fpqqqlpf pqqpqqf	757
			pqqpfpqqqt fpqqqlpf	758
65	pFpFEpEEp	64	qpfppqqpfpwppqqp fpq	759
			qpfppqqpfpwppqqp fpq	760
			qpfppqqpfpwppqqp fpq	761
			qqpfpwppqqp fpqqq	762
			ppfwppqqp fpqtqqsfplq	763
			qqpfpwppqqp fpqqq	764
66	pEESpREg	65	gqqifpqqpeqt fphqq	765
			gqqa fpqqpeqt fphqq	766
			gqqifpqqpqt fphqq	767
			gqqt fpqqpeqt fphqq	768
			gqqa fpqqpqt fphqq	769
			gqqt fpqqpqt fphqq	770
67	SFpREpEEa	66	qqifpqqqt fphqqqa fp	771
			qqtfphqqqa fpqqg	772
			qtfphqqqa fpqqqt fph	773
			qqtfphqqqa fpqqg	774
			pqqtfphqqqa fpqqqt f	775
68	FSEEpSFS	67	pqqqpp fsqqqpsfs qqpp	776
69	aFpEpEESF	68	qqqafpqqpeqt fphqq	777
			qafpqqqt fphqqqqfpq	778
			qafpqqqt fphqqqqfpq	779
			qqqafpqqqt fphqq	780
			qt fphqqqqafpqqqt fph	781
			qqafpqqqt fphqqqqfp	782
			pqqtfphqqqqafpqqqt f	783
70	SEEpFSEpE	69	qqfpeq sqqftqqp qptpi	784
			fpeq sqqftqqp qptpiq	785
71	IEpFpEpEp	70	lqpfppqp flpqlpypq	786
			lqlqpfppqp fppqlpypq	787
			lqlqpfppqp flpqlpypq	788
			lqlqpfppqp fppqlpypq	789
			mq lqpfppqp fppqlpypq	790
			pfpsqqpymqlqpfppqp f	791
			fpsqqpylqlqpfppqp fl	792
			pfpsqqpylqlqpfppqp f	793
			sqqpylqlqpfppqp fppq	794
			pfpsqqpymqlqpfppqp f	795
72	pFpRpEIpF	71	qqpylqlqpfppqp	796
			qlqpfppqp fppqp	797
			lqlqpfppqp fppqp	798
			qlqpfppqp fppqp	799
73	EEIFpEpEE	72	gqqifpqqpeqt fphqq	800
			gqqifpqqpqt fphqq	801
			qqifpqqpqt fphqqqa fp	802
			pqqifpqqpqt fphqqqqf	803
			qqifpqqpqt fphqqqqfp	804

			qqpfsqqpqqifpqqqqtfp	805
			hqpfsqqpqqifpqqqqtfp	806
			qqqqpfsqqpqqifpqqqqt	807
74	EpEESFpER	73	pqqqfiqqpqqqqttypqrpq	808
			qqqqqfiqqpqqqqttypqrp	809
			qqfpqqqqqttypqrpqppfp	810
			pqqpfpqqqqqttypqrpqpp	811
			pqqqfiqqpqqqqttypqrpq	812
			qqpfpqqqqqttypqrpqppf	813
			qqpfpqqqqqttypqrpqppf	814
75	FpERpEEpF	74	qqt ypqrpqppf pqt qppqq	815
			qqfpqqppqt ypqrpqppf p	816
			qqt ypqrpqppf pqtg	817
			qqt ypqrpqppf pqtg	818
			qqpfpqqppqt ypqrpqppf	819
			qqpfpqqppqt ypqrpqppf	820
			qqt ypqrpqppf pqt qppqq	821
			qt ypqrpqppf pqt qppqqp	822
76	IEpFpEpEI	75	ylqlqpfpapqlpypqqlp	823
			pymqlqpfpapqlpypqql	824
			qlqpfpapqlpypqql	825
			qlqpfpapqlpypqpg	826
			lqlqpfpapqlpypqppfr	827
			qlqpfpapqlpypqpp	828
			lqlqpfpapqlpypqppfr	829
			lqlqpfpapqlpypqppelpypqppelpypqppf	830
			mqlqpfpapqlpypqqlpy	831
			qlqpfpapqlpypqpg	832
			qlqpfpapqlpypqql	833
			qlqpfpapqlpypqpp	834
			qlqpfpapqlpypqpg	835
			lqpfpapqlpypqppelpypf	836
			lqlqpfpapqlpypqqlpy	837
			qlqpfpapqlpypqpg	838
			qlqpfpapqlpypqpg	839
			pylqlqpfpapqlpysqpp	840
			qlqpfpapqlpysqpg	841
			lqlqpfpapqlpypqppfr	842
			lqlqpfpapqlpypqppfr	843
			lqlqpfpapqlpysqppfr	844
			lqlqpfpapqlpypqqlpypqppelpypqppf	845
			qlqpfpapqlpysqpg	846
			lqlqpfpapqlpysqppfr	847
			qlqpfpapqlpypqpg	848
			qlqpfpapqlpysqpg	849
			qfpsqlpylqlqpfpapqlp	850
			lqlqpfpapqlpysqppfr	851
			lqlqpfpapqlpysqppfr	852
			gsglqpfpapqlpysg	853
			pfpqqpymqlqpfpapqlp	854
			qlqpfpapqlpysqpg	855

			pfpssqlylqlqpfppqqlp	856
			pfpssqpylqlqpfppqqlp	857
			pfpssqpylqlqpfppqqlp	858
77	EpFpESEES	76	pfpwqppqppfpqtqqs fplq	859
			ppfpqtqqs fplqppqppfpq	860
			fpwqppqppfpqtqqs fplq	861
78	ESScIpgIE	77	metscipgle rpwqqqplqq	862
			etscipgle rpwqeqplppq	863
79	pIIPRgppF	78	sqqqplprgppf sqqtqpv	864
80	EpEEEEfpEp	79	gffp qpeqefpqp qgg	865
			gqqpfp qpeqefpqp g	866
			sqqppqppfp qppqqfppqp qq	867
			gqqpfp qpeqefpqp g	868
			sqqppqppfp qppqqfppqp qq	869
			pqqppfpq qppqqfppqp qppq	870
			ppfp qppqqfppqp qppqqsf	871
			gqqpfpq qpeqefpqp g	872
			qppqqppfpq qppqqfppqp qq	873
			gqqqfs qpeqefpqp g	874
			gffp qppqqfppqp qgg	875
			sqqppqppfp qppqqfppqp qq	876
			gffp qppqqfppqp qgg	877
			gqqqfs qppqqfppqp g	878
			gqqpfpq qpeqefpqp g	879
			gqqpfp qppqqfppqp g	880
			qppqqqfppqp qppqqppfpqp	881
			gqt fph qpeqefpqp g	882
			gfpq qpeqefpqp qgg	883
			pqqppfpq qppqqfppqp qppq	884
			gqqqfs qpeqefpqp g	885
			gffs qppqqfppqp qgg	886
			p qppqqqfppqp qppqqsfppq	887
			gfpq qppqqfppqp qgg	888
			sqqppqqqfs qppqqfppqp qq	889
			sqqppqqqfs qppqqfppqp qq	890
			qqfs qpeqefpqp qq	891
			qsqqppqqqfs qppqqfppqp q	892
			qppqqqfs qppqqfppqp qppq	893
			gppfpq qppqqfppqp g	894
			qppqqppfpq qppqqfppqp qq	895
			pqqppqppfpq qppqqfppqp q	896
			tfppqqatcph qppqqfppqp	897
			gffs qppqqfppqp qgg	898
			tfph qppqqfppqp qppqqpf	899
			qt fph qppqqfppqp qppqqq	900
			gfpq qppqqfppqp qgg	901
			s qppqqqfppqp qppqqsfppq	902
			qt cph qppqqfppqp qppqqp	903
			gqt fph qppqqfppqp g	904
81	nmEadpSgE	80	nmqadpsgq vqwpqqqpf lq	905
			at a nmqadpsgq vqwpqqqp	906

82	gaIcSSISn	81	fdeeknst galcsslsgas	907
83	EFpEEEIpI	82	qppfpqqhqafpqqqipv vq	908
			qqplfpqqhqafpqqqipv v	909
			qfpqqqipv vqpsvlqqlnp	910
84	EEEpIIIEE	83	sqqqqpfpq qqqp111qqpp	911
			qqqqp111qqppfsqhqppv	912
			qqqpfq qqqp111qqppfs	913
			qqqqppfsqq qqqp111qqp	914
			pfsq qqqp111qqqipfvhp	915
			qqqpfq qqqp111qqppfs	916
85	SEEpEESFp	84	qqpl sqqpqqtfp qpqqtfp	917
			hqpf sqqpqqtfp qpqqtfp	918
			qpfqphqpf sqqpqqtfp q	919
			qqpl sqqpqqtfp qqq	920
			pvpqphqpf sqqpqqtfp qp	921
			qqpl sqqpqqtfp qqq	922
			qqlvqqlqqpl sqqpqqtfp	923
			pqlqqpl sqqpqqtfp qpqq	924
86	FRREpEESF	85	phqt fhqppqqtfp pppqqty	925
			qt fhqppqqtfp pppqqtyph	926
			qt fhqppqqtfp pppqqtyph	927
			qrtipqphqt fhqppqqtfp	928
87	RFFFpSSpR	86	sgqqqhwyypstspk lsgqqq	929
88	REpEEEFSE	87	t fphqppqqfsqppppqqf	930
			qt fphqppqqfsqppppqqq	931
89	SIEEIIIEE	88	qqqtlqqilqqq lipcrdv	932
			tlqqilqqq lipcrdvvlqq	933
			qqqqqqqqqtlqqilqqq lip	934
90	IEEpIppEE	89	pwlqqplppqqtlpqqqqp	935
			sniisflkpw lqqplppqq	936
91	pISpEESgE	90	qqqqyyypisppqsgqqpp	937
92	pEpFpEpEp	91	pypqppfpqpp fppqlpy	938
			pfpqqppypqppfpqpp f	939
			pqqppfpqpp fppqlpypq	940
93	EpEpFpEpE	92	pypqppfpqpp fppqlpy	941
			qqpfpqqppyp qppfpqpp	942
			pfpqqppyp qppfpqpp pf	943
			pqqppfpqpp fppqlpypq	944
94	FpEEpEESF	93	ppqqfiqqpp fpqqqqty	945
			qqqfiqqpp fpqqqqty p	946
			ppqqfiqqpp fpqqqqty	947
			ppqqpp fpqqqqsf pqqp	948
			qqp fpqqqqsf pqqq	949
			qp fpqqqqty pqrppqpfp	950
			qqpqqp fpeqqqqsf g	951
			qqpqqp fpqqqqsf g	952
			pqqp fpqqqqsf pqqppqp	953
			pqqp fpqqqqty pqrppqp	954
			qqp fpqqqqsf pqqq	955
			qqpqqp fpeqqqqtf g	956
			pfpqqppqp fpqqqqsf pq	957

			gppqppfpqqpqqtf g	958
			qppfpqqpqqty pqrppqpf	959
			qppfpqqpqqty pqrppqpf	960
95	EESFSEpp	94	pwqqqplppqqfsqpp fs	961
			pwqqqplppqqfsqpp fs	962
			erpwqqqplppqqfsqpp	963
			pqqfsqpp fsqqqqqplp	964
			qqfsqpp fsqqqqqplp	965
			qplppqqfsqpp fsqqqq	966
			pwqqqplppqqfsqpp fs	967
96	FpEEpFpEE	95	ypqqpfpqqpqqpfpqqpf	968
			yqqqpfpqqpqqpypsq	969
			lpqpyaqpylpypqqfpp	970
			pqqfsyqqqpfpqqpypq	971
			pfqqpypqqpypsqpyp	972
			qelqspqlypqqpypqqpy	973
			yaqpylpypqqpfpqqpqq	974
			qppfpqqpypqqpypsqpy	975
97	EpSSEpIS	96	qpsqqpls qhqqfpqqi	976
			qppfsqqqpsqqpls q	977
98	EpIEERESF	97	qlerpwqqqplqqketfpq	978
99	ISpEEIqEg	98	qgyypispqqlqgqqsg	979
100	EEeccERIp	99	qsschvmqqqcoqripqipe	980
101	agEgEEqFF	100	gqagqqqqyyptspqqlg	981
102	EEEpFpEpE	101	gqvqwpqqpfpqqpfpce	982
			pqqpfpqqpfpfsqqp	983
			wpqqpfpqqpfpfqqqp	984
			qqqpfpqqpfpqqpfpqq	985
			psgqvqwpqqpfpqqpfp	986
			pqqpfpqqpfpceqqprt	987
			qqpfpqqpfpceqqprti	988
			psgqvqwpqqpfpqqpfp	989
			qqqpfpqqpfpfsqqpqi	990
			gqvqwpqqpfpqqpfp	991
			psgqvqwpqqpfpqqpfp	992
			qqpfpqqpfpceqqprti	993
			vdpsgqvqwpqqpfpqqp	994
103	EIEFpEEEE	102	psgqvqwpqqpfpqqp	995
			niqvdpqgqvqwpqqpfp	996
			gqvqwpqqpfpqqpfp	997
			psgqvqwpqqpfpqqp	998
			ttaniquvdpqgqvqwpqqp	999
			vdpsgqvqwpqqpfpqqp	1000
			qivfpsgqvqwpqqpfp	1001
			gqvqwpqqpfpqqp	1002
			gqvqwpqqpfpqqp	1003
104	EpIEEiccE	103	qstyqplqqlccqqlwqipe	1004
			qstyqplqqlccqqlwqipe	1005
			qstyqplqqlccqqlwqipe	1006
105	pFpEpEFpS	104	ppqqpypqqpfpq qlylql	1007
			gqqqpfppqqpypqqpfp	1008

			qqpfppqqppypqqfqs qlp	1009
			qqypqqqfqs qlpylqlqp	1010
106	aIESIpSmc	105	feeirnlalqtlpmscnvyi	1011
			rnlalqtlpmscnvyippyc	1012
			eirnlalqtlpmscnvyipp	1013
107	RIFEIpERI	106	elccqhlwqiipekl qcqaih	1014
			elccqhlwqiipekl qcqaih	1015
			glccqhlweipekl qg	1016
			glccqhlwqiipekl qg	1017
			lccqhlwqiipekl qcqaihn	1018
108	pFpESEESF	107	pfpwqppqqpfqtqqsflq	1019
			qpfqtqqsflqppqqpfpq	1020
			fpwqppqqpfqtqqsflq	1021
			pfqtqqsflqppqqpfpq	1022
109	EgFFEpSEE	108	gqgffqpsqqnpqaqgsfq	1023
			gqgffqpsqqnpqaqg	1024
			qqypsgqgffqpsqqnpqaq	1025
			qqypsgqgffqpsqqnpqaq	1026
			gqgffqpsqqnpqaqg	1027
			psgqgffqpsqqnpqaqgsf	1028
			qqypsgqgffqpsqqnpqaq	1029
110	ESIFESScR	109	arsqtlwqsschvmqqccr	1030
111	ISSIFSIII	110	llqqckpvs.lvsslwsiilp	1031
			lvsslwsiilppsdqvmrq	1032
			lvsslwsiilppsdqvmrq	1033
112	ESFpEpEES	111	qqqtfpqqqt fphqg	1034
			qqtfpqqqt fphqppqqfp	1035
			qqqtfpqqqt fphqg	1036
			qqqqt fphqppqq	1037
			phqt fhhqppqt fphqppqt y	1038
			qqplsqppqt fphqppqt fp	1039
			qtfpqqqt yphqppqqfpq	1040
			hqpfsqqppqt fphqppqt fp	1041
			qqtfpqqqt fphqppqqvp	1042
			qtfpqqqt yphqppqqfpq	1043
			qtfhhqppqt fphqppqt yph	1044
			hhqppqt fphqppqt yphqpp	1045
			qqtfpqqqt fphqppqqfs	1046
			qtfpqqqt yphqppqqfpq	1047
			qtfhhqppqt fphqppqt yph	1048
			hhqppqt fphqppqt yphqpp	1049
113	mEnSRIPgI	112	menshipgl erpsrqqlpp	1050
			menshipgl erlsqqqlpp	1051
			menshipgl egpsqqqlpp	1052
114	EEcSpIaIp	113	kvflqqcspvaipyrlars	1053
115	pFSEEEIIP	114	qppfsqqqqt pfsqqqapv	1054
			sqqqpppfsqqqapvihps	1055
			qqqqtpfsqqqapvihpsv	1056
116	ESRcIpgIE	115	etrcipgle rpwqqqlppq	1057
			metrcipgle rpwqqqlpp	1058
117	IpSIERpIE	116	metshipslekplqqqlpl	1059

			cashipslekplq qqplplq	1060
118	aEIpFpEEp	117	qqpfpqpqq aqlpfpqqp qq	1061
			ppqaqlpfpqqp qqpfpqpqq	1062
			qaqlpfpqqp qqpfpqpqqp	1063
			qqpfpqpqq aqlpfpqqp qq	1064
			qpfpqpqq aqlpfpqqp qqp	1065
119	SIIRSIpn	118	qppaqyevirslvrltpnm	1066
			qyevirslvrltpnmcnvy	1067
			qyevirslvrltpnmcnvy	1068
120	aEIEgIRSI	119	qpqqp aqlegirslvktlp	1069
			iiqqqp aqlegirslvkt	1070
121	EEpaEIEgI	120	qlaqqlgiiqp qppaqlegi	1071
			qpqqp aqlegi rslvktlp	1072
			iiqqqp aqlegi rslvkt	1073
122	SpIampERI	121	ckvflqqc spvampqrl ar	1074
			lqqc spvampqrl ar	1075
			vflqqc spvampqrl arsqm	1076
			qqc spvampqrl arsqmwq	1077
			c spvampqrl arsqmwqqs	1078
			qc spvampqhl arsqmwqqs	1079
			ckvflqqc spvampqrl ar	1080
			qqc spvampqrl arsqmwq	1081
			vflqqc spvampqhl arsq	1082
			vflqqc spvampqrl arsq	1083
			spvampqrl arsqmlqqssc	1084
123	EInpcRnFI	122	qqlnpcknfl lqqckpvsiv	1085
			sliqqslqqqlnpcknfl lq	1086
			qpslqqqvnpcnfl lqqck	1087
			iqqslqqqlnpcknfl lqqc	1088
			iqpslqqqvnpcnfl lqqc	1089
			lqqqvnpcnfl lqqcklvs	1090
124	IEpEEIaEI	123	qgtflqqqvaql elmtsia	1091
125	EFSEEEEp	124	qqp qfsqqqqip vihpsvlg	1092
			qppfsqqqqp qfsqqqqip v	1093
126	FpEpEpFpp	125	lqlqp fpqpfpfp qlpypq	1094
			qpfpqqp yppqpfpfp qlp	1095
			pypqpfpfpqpfpfp qlpy	1096
			lqlqp fpqpfpfp qlpypq	1097
			mqlqp fpqpfpfp qlpypq	1098
			qqpfpqqp yppqpfpfp ql	1099
			pfpqpfpfp qlpypqpppf	1100
			pfpqpfpfp qlpypqpsf	1101
			pqpfpfpqpfpfp qlpypq	1102
			sqppylqlqp fpqpfpfp q	1103
			pfpqqp yppqpfpfp qlpy	1104
127	FpEpEEpFc	126	qqqp fpqpfpfc qgg	1105
			qqvqwpqqp fpqpfpfc e	1106
			wpqqp fpqpfpfc qgpqg	1107
			qqqp fpqpfpfc qgg	1108
			pqqp fpqpfpfc eqpqt	1109
			qqqp fpqpfpfc qgpqti	1110

			fpqpqqpfccqppqrtipqph	1111
			qqqpfpqpqqpfccqppqrti	1112
128	EEIpEIpEE	127	ccqqlpqipeqsryearairai	1113
			sschvmqqqccqqlpqiqq	1114
			qccqqlpqiqqsrqyqaira	1115
			qcccqqlpqiqqsryearair	1116
			qccqqlpqipeqsrseaira	1117
			qccqqlpqiqqsrqyqaira	1118
			hvmqqqccqqlpqiqqsrqy	1119
			qcccqqlpqipeqsrqydair	1120
			qccqqlpqipeqsrqydvira	1121
			cqqlpqiqqsryearairaii	1122
129	pEESEEIip	128	fpqpqlpfqqseqiipqql	1123
			qqseqiipqqlqqpfplqp	1124
			qqseqiipqqlqqpfplqp	1125
			fpqpqlpfqqseqiipqql	1126
130	pnnnSpSnR	129	plnnnspnnspnshhns	1127
			nnsppnnspnshhnsppnn	1128
			plnnnspnnspnshhns	1129
			nnsppnnspnshhnsppnn	1130
			nnsppnnspnshhnsppnn	1131
131	mEEEEEEER	130	iiqqqqqqqrqqvqi	1132
			ivhsiiqqqqqqqrqqvqi	1133
			ivhsiiqqqqqqqrq	1134
			sivhsiiqqqqqqqrqqvq	1135
			ivhsiiqqqqqqqrqqvqi	1136
132	EEmpcRnF	131	qqmpcknflqqcnhsvlv	1137
			iqsflqqmpcknflqqc	1138
			qsflqqmpcknflqqcn	1139
			iqpylqqmpcknyllqqc	1140
			iqpylqqmpcknyllqqc	1141
			lqqmpcknyllqqcnpvs	1142
133	cnInIpIFR	132	tmcnvnplyr ttrvpfgv	1143
			tsfalrtlptm cnvnplyr	1144
134	IISIIpRS	133	cnhsvlvsslvsiiilprdc	1145
			hsvlvsslvsiiilprdcqv	1146
			lvsslvsiiilprdcqvmqq	1147
135	EIaEIpEES	134	schvmqqqccqqlaqipeqs	1148
			qccqqlaqipeqs rheaira	1149
136	RpFIEEpIp	135	mesniiisflkpwlqqplpp	1150
			sniiisflkpwlqqplppq	1151
137	pFpEpEEpE	136	qqpddfdpbbddfdpqqqq	1152
			ppddfdpbbddfdpqqqq	1153
			qldfdpbbddfdpqqqq	1154
			qddfdpbbddfdpqqqq	1155
			qqqqqfppqqqldpqqq	1156
			ppqqqfppqqqldpqqq	1157
			qqqqqfppqqqldpqqq	1158
			ppqqqfppqqqldpqqq	1159
			ppqqqfppqqqldpqqq	1160
			skppqqqfppqqqldpqqq	1161

			qskqpqqpfpqpqqpqsfp	1162
			gqqpfpqpeqpqlpfg	1163
			qqpfpqpqqpqlpfpqpqq	1164
			gqqpfpqpeqpqpfg	1165
			gqqpfpqpqqpqlpfg	1166
			qqpfpqpqqpqpfpqlqp	1167
			gqqpfpqpeqpqsfg	1168
			gqvqwpqqqqpfpqpqqp	1169
			pqqpfpqpqqpqpfpqlqp	1170
			gqqpfpqpqqpqpfg	1171
			gqqpfpqpqqpqsfg	1172
			qqpfpqpqqpqpfpqsqp	1173
			pfqpqqpqsfpqqqpli	1174
138	FpEpEEpEE	137	pqqpfpqpqqpqpfpqpqq	1175
			qlpfpqpqqpfpqpqqp	1176
			pqqpfpqpqqpfpqpqq	1177
			qpfpqpqqpfpqpqqpqsfp	1178
			sqqpqqpfpqpqqpqsfpq	1179
			qqqpfpqpqqpqpfpqpqq	1180
			skqpqqpfpqpqqpqsfpq	1181
			qqpfpqpqqpqlqpqqpf	1182
			qskqpqqpfpqpqqpqsfp	1183
			qqpfpqpqqpfpqpqqp	1184
			gqqpfpqpeqpqpfg	1185
			gfpqpqqpqsfpqqg	1186
			qqpqqpfpqpqqpqpfpqp	1187
			gfpqpqqpqpfpqqg	1188
			pqpqqpfpqpqqpqsfpqq	1189
			gqqpfpqpeqpqsfg	1190
			gfpqpqqpqpfpqqg	1191
			fpqpqqpqlqpqpfpq	1192
			qqpfpqpqqpqpfpqlqp	1193
			pqqpfpqpqqpqpfpqpqq	1194
			gqqpfpqpeqpqsfg	1195
			gqvqwpqqqqpfpqpqqp	1196
			pqqpfpqpqqpqpfpqlqp	1197
			gqqpfpqpqqpqpfg	1198
			gqqpfpqpqqpqsfg	1199
			qqpfpqpqqpqpfpqsqp	1200
			gfpqpqqpqsfpqqg	1201
			pfqpqqpqsfpqqqpli	1202
			gqqpfpqpqqpqsfg	1203
			gqqpfpqpqqpqpfg	1204
			tfhpqpqqpfpqpqqpqp	1205
			qt fhpqpqqpfpqpqqpqp	1206
			sqpqqpfpqpqqpqsfpqq	1207
			qtcphqpqqpfpqpqqpqp	1208
			gqqpfpqpeqpqpfg	1209
			qqpfpqpqqpqlqpqpfp	1210
			qqpfpqpqqpqlqpqpfp	1211
139	EEIEEIceE	138	lqqssyqqlqqlcoqqlfqi	1212

			qssyqqlqqlccqqlfqipe	1213
140	pEESFpEES	139	pqqsfpqqs qqsqqpfaqpq	1214
			pqqqqpipvqppqsfpqqs q	1215
			qqqqpipvqppqsfpqqs qq	1216
			vqppqsfpqqs qqsqqpfaq	1217
141	IFpEpEpEF	140	rpqqlypqqpqqy sqqqqpi	1218
			qpfrrqqlypqqpqqy sqqq	1219
142	EEpFpEEpE	141	qqrfpqppqqpfpqqpqpip	1220
			qqfliqqqqrfpqppqqpypq	1221
			plqqqqrfpqppqqpfpqqq	1222
			pqqqfliqqqqrfpqppqqaty	1223
			pqqrfpqppqqqqrfpqppqqq	1224
			pqqqqfpqqppqqqqrfpqppq	1225
			tqqpqqrfpqppqqpfpqtq	1226
			pqqrfpqppqqppqqpfpqqq	1227
			qqpfpqtqqpqqrfpqppqq	1228
			qtqqpqqrfpqppqqpfpqt	1229
			qqpqqrfpqppqqpfpqqpqq	1230
			qqpfpqqppqqpfpqtqqpqq	1231
			tpiqqqqrfpqppqqppqqf	1232
			qqypqqppqqpfpqtqqpqq	1233
			qqqliqqqqrfpqppqqaty	1234
			plqqqqrfpqppqqppqqpfp	1235
			pqqqfliqqqqrfpqppqqaty	1236
			qqfpqqppqqqqrfpqppqq	1237
			fpqqpqqrfpqppqqpfpqqp	1238
			pqqpflqqqqrfpqppqqp	1239
			plqqqqrfpqppqqpfpqqp	1240
			qqpqqrfpqppqqpfg	1241
			ypqqrfpqppqqpfpqqppf	1242
			pqqpqqrfpqppqqsfpqpp	1243
			pqqrfpqppqqpfpqqppqq	1244
			qqpfpqqppqqpssqqppfpq	1245
			pqqqfliqqqqrfpqppqqpy	1246
			plqqqqrfpqppqqpfpqqp	1247
			pqqqqfpqqppqqqqrfpqppq	1248
			qqpqqrfpqppqqpfg	1249
			rqqpfpqqpqqypqqppqqp	1250
			qqpqqrfpqppqqsfq	1251
			qqpqqrfpqppqqsfq	1252
			pqqrfpqppqqsfpqppqqp	1253
			qqpfpqqppqqypqqppqqp	1254
			qqpqqrfpqppqqpfpqtqqp	1255
			qqpfpqtqqpqqrfpqppqq	1256
			fpqqpqqypqqppqqpfpqt	1257
			pqqrfpqppqqatyppqqpp	1258
			qqpqqrfpqppqqpfpqqp	1259
			pfppqqqqypqqppqq	1260
			qqpqqrfpqppqqatfg	1261
			pfppqqpqqrfpqppqqsfq	1262
			qqpqqrfpqppqqatfg	1263

			yaqpylpyrqqfppqqpqp	1264
			ppqpqqfppqqpqqfppqp	1265
			gqpqqfpeqqpqqfg	1266
			ppqpqqypqqpqlfpqtq	1267
			gqpqqfppqqpqqfg	1268
			qqfppqqpqtypqrppqpf	1269
			qqfppqqpqtypqrppqpf	1270
			lqpqqfppqqpqqypqqp	1271
			prqpfpqqpqqypqqpqp	1272
143	EIaEIEImS	142	qgtflqpqqvaqlmltsia	1273
			qqqqqqlahqiaqlevmtsi	1274
			qphqiaqlevmtsialrilp	1275
			phqiaqlevmtsfalrtlpt	1276
			hqiaqlevmtsialrilptm	1277
			gtllqphqiaqlevmtsial	1278
			qiaqlevmtsfalrtlptmc	1279
			tlqphqiaqlelmtsialr	1280
			flqphqiaqlevmtsiaprt	1281
			qgtflqphqiaqlevmtsia	1282
			qiaqlevmtsialrilptmc	1283
144	FEIpEESEc	143	elccqhlwqipeqsqcqaih	1284
			hlwqipeqsqcqaiqnrvha	1285
			qhlwqipeqsqcqaihkvvh	1286
			elccqhlwqipeqsqcqaih	1287
145	EEEEEEIlg	144	qsgqqlsqsqqqsqqlgqc	1288
			qsdqgvsqsqqsqqlgqc	1289
			qgvsqsqqsqqlgqcsfq	1290
			filsvsqpqqsqqlgqq	1291
			qcvsqpqqsqqlgqqpqq	1292
			qqsgqgvsqsqqsqqlgq	1293
			cvsqpqqsqqlgqqpqq	1294
			yqpqqsqqlgqcsfqppq	1295
			qsqqsqqlgqcsfqppq	1296
			qpqqsqqlgqqpqqppq	1297
			qlgqcvsqpqqsqqlgqq	1298
			qlgqcvsqpqqsqqlgqq	1299
146	SIIEpSIIE	145	isivqpsilqqlnqckvflq	1300
			ppqqisivqpsvlqqlnqck	1301
			qqqlppqqisivqpsilqql	1302
147	FSaSSSIRF	146	plysattsvrfgvgtgvgay	1303
			vplysattsvrfgvgtgvga	1304
148	REEEEEEEI	147	aiimhqgeqqqqlqqqqqq	1305
			gqmhqgeqqqqlqqq	1306
			hqgeqqqqlqqqqqqqlqq	1307
			iimhqgeqqqqlqqqqqqql	1308
			gqmhqgeqqqqlqqq	1309
149	IIIEEISpc	148	lqqilqqqltpcmdvvlqqh	1310
			qqqqqqilqqilqqqltpc	1311
			ilqqilqqqltpcmdvvlqq	1312
150	EEIpEEEEI	149	qqvlpqqqipfvhpsilqql	1313
			qlppfsqqqqvlpqqqipf	1314

151	FSEEEEpFp	150	fsqqqqppqfsqqqqppqq	1315
			fsqqqqppqfsqqqqppqq	1316
			ppfsqqqqppqfsqqqqppqq	1317
152	cIpgIERpF	151	metrcipglerpwqqqplqq	1318
			etrqipglerpwqqqplppq	1319
			nrqipglerpwqqqplppq	1320
			metrcipglerpwqqqplpp	1321
			mdtscipglerpwqqqplpp	1322
			etsqipglerpwqqqplppq	1323
153	EEEcIpIam	152	mvflqqqipvamqrclars	1324
			lnpckvflqqqipvamqrc	1325
154	EIaEIpREI	153	vmqqccqqlaqiprqlqca	1326
			qccqqlaqiprqlqcaaihs	1327
			mqqccqqlaqiprqlqcaa	1328
			qlaqiprqlqcaaihsvhs	1329
155	EEpREFpEE	154	hhqqqpiaqqphqfpqqpc	1330
156	RpmFIEpEE	155	ypqqrpmlylqqqplsqqa	1331
			sfppqqpyqqrpmlylqqq	1332
			ypqqrpmlylqqqplsqqa	1333
157	IEEEmnpCR	156	iqsflqqqmpcknflqqc	1334
			qsflqqqmpcknflqqcn	1335
			iqpylqqqmpcknyllqqc	1336
			ppqqqpaiaqsflqqqmpck	1337
			iqpylqqqmpcknyllqqc	1338
			lqqqmpcknyllqqcnpvs	1339
158	SRIISpRqR	157	srlsprgkelhtpqeqfpq	1340
			srlsprgkelhtpqeqfpq	1341
159	REEEEEEEp	158	iilhqqqqqqpssqvsllq	1342
160	dcEImEEEc	159	ilprsdcqvmqqccqqlaq	1343
			smilprsdcqvmqqccqql	1344
			vsilprsdcqvmqqccq	1345
161	SEpEIpFSE	160	qpylqlqpfsqqlpysqpp	1346
			lqlqpfsqqlpysqppfr	1347
			sqqpylqlqpfsqqlpysq	1348
			lqlqpfsqqlpysqppfr	1349
162	EIpFSEEE	161	qqqpilqqlpfsqqqqpvlp	1350
			plisqqqlpfsqqqqpqlfs	1351
			psflqqqpilqqlpfsqqqq	1352
163	EEpFpIEpE	162	ppqqqqpflqqqppfpqq	1353
			ppqqqqpflqqqppfpqq	1354
			ppqlqqpflqqqppfpqq	1355
			ppqqqqpflqqqppfpqq	1356
			ppqqpflqqqqsflwqsqqp	1357
			seqiipqqlqqpflqqq	1358
			ppqqpflqqqqsflwqsqqp	1359
164	RFdaIRaII	163	pripeqsrydairaiiysiv	1360
			qsrydairaiiysivlqeqq	1361
			qsrydairaiiysivlqeqq	1362
			pripeqsrydairaiiysiv	1363
165	ESRFdaIRa	164	pripeqsrydairaiiysiv	1364
			qsrydairaiiysivlqeqq	1365

			peqsrydaira itypilqe	1366
			qccqqlpripeqsrydaira	1367
			eqsrydaira itysilqeq	1368
			qccqqlpripeqsrydaira	1369
			qsrydaira iiysivlqeqq	1370
			pripeqsrydaira iiysiv	1371
166	EpSpEpEEI	165	flqqpqqpsppqqqv vqiis	1372
			sqqpflqqpqqpsppqqqv	1373
			pqqpsppqqqv vqiispatp	1374
167	SIREEpIIP	166	qppfslhqppvlpqqqipyv	1375
			qppfslhqppvlpqqqipyv	1376
			qpilpqqppfslhqppvlpq	1377
			qpilpqqppfslhqppvlpq	1378
168	ppFSIREEp	167	qqqqqpilpqqppfslhqpp	1379
			qppfslhqppvlpqqqipyv	1380
			qppfslhqppvlpqqqipyv	1381
			qpilpqqppfslhqppvlpq	1382
			qpilpqqppfslhqppvlpq	1383
169	FpIIIEEEE	168	dairaitypilqeqqggfv	1384
170	FSEEEppF	169	pfsqqqqppfsqqqqvlpq	1385
			qpppfsqqqqppfsqqplis	1386
			qpsfsqqqqppfsqqqqpfs	1387
			qqqqpftqqqqppfsqqppi	1388
			ppfsqqqqpsfsqqqqppfs	1389
			qqqqppfsqqqqppfsqqqq	1390
			sqqqqappfsqqqqppfsqq	1391
			fsqqqqppfsqqqqppfsqq	1392
			psfsqqqqppftqqqqppf	1393
			vlpqqppfsqqqqppfsrst	1394
			isqqqqappfsqqqqppfsq	1395
			ppfsqqqqppfsqqqqpfs	1396
			fsqqqqppfsrsthsqqpp	1397
			isqqqqppfsqqqqppfsq	1398
			qppysqqqqppfsqqqqppf	1399
			qrqlppfsqqqqppfsqqqq	1400
			fsqqqqppfsqqqqppysqq	1401
			eqqppfsqqqqppfsqqqqp	1402
			pfsqqqqppfsqhqqppvlpq	1403
			ysqqqqppfsqqqqppfsqq	1404
			qqqqqqppftqqqqppfsq	1405
			fsqqqqppfsqqqqppftq	1406
			qqqqppfsqqqqppfsqqqq	1407
			ftqqqqppfsqqspisqqqq	1408
			niqqqqppfsqqqqppfsqq	1409
			qqqqppftqqqqppfsqqspi	1410
171	EREEpIIPe	170	sqhqppvlpqqqipsvqpsi	1411
			qqplfsqkqppvlpqqpafs	1412
			plfsqkqppvlpqqppfsqq	1413
			sqqqppfsqhqqppvlpqq	1414
			pfsqqqqppfsqhqqppvlpq	1415
172	EEppFSEES	171	fsqppppfsqqppvlpqq	1416

			ftqqqqppfsqqspisqqqq	1417
			qqqppftqqqqppfsqqspi	1418
173	EEEEEEEp	172	qqqqqqqqpplsqvsfqppq	1419
			qqqqqqqqpplsqvcfqqsq	1420
			pfsqqqqqqqqppfsqqq	1421
			gsgqqqqqqppgsg	1422
			ppfsqqqqqqppfpqqpsf	1423
			qqqqspfsqqqqqqppfl	1424
			spisqqqqqqqqqqppftq	1425
			sqqqqqqqqppflqqqqppf	1426
			qqqqqqqqpplsqvg	1427
			qqqqqqqqqqppssqv	1428
			qqqqppftqqqqqqqqppf	1429
			qqqqqqqqpplsqvg	1430
			qqqqqqqqppssqvsfqppq	1431
			qqqqqqqqppftqqqqppfsq	1432
			qqppfsqqqqqqqqppfpqq	1433
			qqqqqqqqqqpplsqvcf	1434
			qqqqqqqqqqpplsqvsf	1435
			ilhqqhhhhqqqqqqqqpp	1436
			qqppfsqqqqqqqqppfsq	1437
			qqqqqqqqpplsqvsfqppq	1438
			hhhqqqqqqqqpplsqvsf	1439
			aiilhqqqqqqqqqqppls	1440
174	EEEEppFS	173	pfsqqqqqqqqqqppfsqqq	1441
			sqqqppfsqqqqppfsqqq	1442
			isqqqqppfsqqqqppfsq	1443
			psfsqqqqppftqqqqppf	1444
			fsqqqqppfsqqqqppftq	1445
			qqppfsqqqqqqqqqqppfsq	1446
175	pSIEpSIIE	174	qipevqpsilqqlncpcklfl	1447
			pvlpqqqipevqpsilqqln	1448
176	pEEElqEEp	175	qqqlgqcsfqppqqqlgqqp	1449
			qlssqvsfqppqqqlgqqp	1450
			sfqqppqqqlgqqpqqqqqv	1451
			qpqqqlgqqpqqqqqqvlg	1452
			sfqqppqqqlgqqpqqqqqv	1453
			qqqlgqcsfqppqqqlgqqp	1454
			csfqppqqqlgqqpqqqqqv	1455
177	cSFEEpEEE	176	qqqlgqcsfqppqqqlgqqp	1456
			lgqcsfqppqqqlgqwpqq	1457
			sqqqlgqcsfqppqqqlgqq	1458
			qsqqqlgqcsfqppqqqlgq	1459
			qqqlgqcsfqppqqqlgqqp	1460
			csfqppqqqlgqqpqqqqqv	1461
178	REIccERIF	177	gplrelccqhlwqipg	1462
			qstyqllrelccqhlwqipe	1463
			qstyqllrelccqhlwqipe	1464
			gplrelccehlwqipg	1465
			qstyqllrelccqhlwqipe	1466
179	IEEEpIIPe	178	peppfslqqppvlppqspfs	1467

			qqpilpeppfs lqqqvlpq	1468
			psflqqpilpqlpfsqqqq	1469
			pfsqqpsflqqpilpqlp	1470
180	ERppFSEEE	179	qrppfsfbbbsvlpqqppf	1471
			lqqpdsqqrppfsfbbbs	1472
			qrppfsfbbbsvlpqqppf	1473
			lqqpdsqqrppfsfbbbs	1474
181	mIFIEEEcI	180	svlqqlnpcmvflqqqci pv	1475
			mvflqqqci pvamqrclars	1476
182	EEERpFIEp	181	qqsfqqqrpfisqlqqql	1477
			qqqqqqsfqqqrpfis	1478
			fqqqqrpfisqlqqqlnpc	1479
183	SFpEIpqEI	182	gyyp tfpqlpgql qppaqqq	1480
184	IEEEIIPeI	183	ggqvqlwleqlvpql g	1481
			psggqvqlwleqlvpql qql	1482
			ggqvqlwleqlvpql g	1483
			ggqvqlwleqlvpql g	1484
			psggqvqlwleqlvpql qql	1485
185	ppFIEpSIE	184	fpqqppffiqpslqqvnpq	1486
			ppqqppffiqpslqqvnpqk	1487
			qqppqsfpqqppffiqpslq	1488
186	IIPeEpaFS	185	qqplfsqkqqpvlppqpa fs	1489
			kqqpvlppqpa fs qqqtvl	1490
			qqqtvlppqpa fs qqhqql	1491
187	pEpEEeIpE	186	lqqpqqfppqqqlppqg	1492
			qqpffppqqqlppqg	1493
			lqqpqqfppqqqlppqg	1494
			qqpffppqqqlppqg	1495
			qqpqqqlppqqppqqsf	1496
			pppqqqlppqqppqqsfppq	1497
188	gSanmEIdp	187	gtanmqvdp ssgqvwpqqpp	1498
			gtanmqvdp ssgqvwpqqpp	1499
			gtanmqvdp ssgqvwpqqpp	1500
189	EEEqmRIFI	188	qqqqqqqqqqmhf1 plsqg	1501
			imqqqqqqqqqqmhf1 pl	1502
			qqqqqqmhf1 plsqqqvqq	1503
190	RIIRaIIR	189	qgaihkvvhailh qqgkqq	1504
			qgaihkvvhailh qqgkqq	1505
191	IpIFgSSSS	190	lrtlpmmsvnpvygttts	1506
			lptmcgvn vplygttts vpf	1507
			vpvygttts vpfvgvtqvga	1508
			csvnvpvygttts vpfvgvt	1509
192	pEEIgeEEpE	191	pppqlqqppqqqevpvaf	1510
			qcsfqppppqqqlqqppqqe	1511
193	ESgEEeIIE	192	qqvsqqppqqsgqqqlvq csf	1512
			qsgqqqlvq csfqppppqqql	1513
194	FppEIpFpE	193	ppp fppqlpyppppqlpypp	1514
			ppp fppqlpyppppqlpypp	1515
			pp fppqlpyppppppfrppq	1516
			ppp fppqlpyppppqlpypp	1517
			lqlppfpqqpp fppqlpypp	1518

			ppq fppqlpypqppqfrpqq	1519
			ppq fppqlpypqpppfsppq	1520
			lqlqpfppqppfppqlpypq	1521
			ppq fppqlpypqppqs fppqq	1522
			mqlqpfppqppfppqlpypq	1523
			gppqpfppalypypqpg	1524
			gppqpfppqlpypqpg	1525
			pfpqppqpfppqlpypqpppf	1526
			pfpqppqpfppqlpypqppsf	1527
			ppqppfppqppfppqlpypq	1528
			ppq fppqlpypqpppfsppq	1529
			gsg fppalypypqpg	1530
			ppqppfppqlpypqtqpfpp	1531
			ppq fppqlpypqtqpfppqq	1532
			qp fppqlpypqtqpfppqqq	1533
195	cSpIampER	194	ckvflqqg cspvampqrlar	1534
			lqqg cspvampqrlar	1535
			vflqqg cspvampqrlarsqm	1536
			lnpckvflqqg cspvampqr	1537
			qqg cspvampqrlarsqmww	1538
			cspvampqrlarsqmwwqqs	1539
			q cspvampqhlarsqmwwqs	1540
			ckvflqqg cspvampqrlar	1541
			qlnpckvflqqg cspvampqr	1542
			qqg cspvampqrlarsqmww	1543
			vflqqg cspvampqhlarsq	1544
			vflqqg cspvampqrlarsq	1545
196	dEESgEgEE	195	sgqrqgdqsgqqqppqqrq	1546
197	EIEESIIFg	196	tppqqlqgsilwgipallr	1547
198	pFSEEEIpI	197	qpppfsqqelpilpqppfs	1548
			qqpppfsqqpppfsqqelpi	1549
			fsqqpppfsqqelpilpqpp	1550
199	SSRIpgIER	198	metshipglekpsqqqplpl	1551
			metsrvglekpwqqqplpp	1552
200	SIaIRSIpm	199	lmt sialrtlpmmcsvnvpv	1553
			hlevmt sialrtlpmmcsvn	1554

Figura 6

- Secuencia 1: P(QR)P(QE)LP(FY)PQ (SEQ ID NO: 1555)
 Péptido de respuesta óptima: PQLPYQPQLPYQPQFFRP (SEQ ID NO: 1556)
 Péptido de alta calidad: QLQPFQPELPYPQPQP (SEQ ID NO: 1557)
 Grupos incluidos: 1, 2, 7, 8, 10, 16, 22, 23, 72
- Secuencia 2: P(FY)P(QR)P(QE)LP(FY) (SEQ ID NO: 1558)
 Péptido de respuesta óptima: PQLPYQPQLPYQPQFFRP (SEQ ID NO: 1559)
 Péptido de alta calidad: QLQPFQPELPYPQPQP (SEQ ID NO: 1560)
 Grupos incluidos: 1, 2, 7, 8, 10, 16, 22, 23, 72, 76 PARTE
- Secuencia 3: (PIAT)FPQ(PT)(QE)Q(PTS)(FITY) (SEQ ID NO: 1561)
 Péptido de respuesta óptima: QPFPQPQFPFWQPQFPFPQ (SEQ ID NO: 1562)
 Péptido de alta calidad: GQQPFPQPEQFPFWQG (SEQ ID NO: 1563)
 GQQPFPQPEQPIPVQG (SEQ ID NO: 1564)
 Grupos incluidos: 3, 5, 6, 9, 20, 24, 29, 60, 69, 70, 73, 74, 77, 102PT, 108, 112
- Secuencia 4: PQ(PT)(QE)Q(PTS)(FIY)(PS)(VWHQL) (SEQ ID NO: 1565)
 Péptido de respuesta óptima: QPFPQPQFPFWQPQFPFPQ (SEQ ID NO: 1566)
 Péptido de alta calidad: GQQPFPQPEQFPFWQG (SEQ ID NO: 1567)
 GQQPFPQPEQPIPVQG (SEQ ID NO: 1568)
 Grupos incluidos: 3, 5, 6, 9, 20, 60, 66, 69, 73, 74, 77, PARTE 86
 (3 Y 4 SOLAPADOS)
 Estado: Similar a Secuencia 3
- Secuencia 5: (KQW)(QR)P(QE)Q(SPIT)(FLY)PQ (SEQ ID NO: 1569)
 Péptido de respuesta óptima: QPQLPFPQPPQPPQFPFPQ (SEQ ID NO: 1570)
 Péptido de alta calidad: GFFPQTQPEQFPFPQ (SEQ ID NO: 1571)
 Grupos incluidos: 11, 12, 32, 54, 55, 56, 59, 61, 62, 65
- Secuencia 6: P(FIYL)(PS)(QE)(QR)P(QE)Q(PT) (SEQ ID NO: 1572)
 Péptido de respuesta óptima: PLQPQFPFPQPPQFPFPQ (SEQ ID NO: 1573)
 Péptido de alta calidad: GQFPPEQPPQFPFPQ (SEQ ID NO: 1574)
 Grupos incluidos: 32PT, 54, 55, 56, 57, 61, 62, 63PT, 75, 85.94PT
- Secuencia 7: FLP(QE)LPYPQ (SEQ ID NO: 1575)
 Péptido de respuesta óptima: LQLQFPFPQFPFLPQLPYQP (SEQ ID NO: 1576)
 Péptido de alta calidad: PQQPFLPELPYPQPQS (SEQ ID NO: 1577)
 Grupos incluidos: 13, 27, 71 PARTE
- Secuencia 8: LQQIL(QE)QQL (SEQ ID NO: 1578)
 Péptido de respuesta óptima: LQQILQQQLTPCMDVVLQOH (SEQ ID NO: 1579)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 14, 89
- Secuencia 9: FSYQ(EQ)QFPFPQ (SEQ ID NO: 1580)
 Péptido de respuesta óptima: PQQSFSYQQFPFPQFPYPQ (SEQ ID NO: 1581)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 15, 96PT
- Secuencia 10: FPS(QE)(LQ)PY(LM)Q (SEQ ID NO: 1582)
 Péptido de respuesta óptima: PFPSPQPYLQLQFPFPQLP (SEQ ID NO: 1583)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 16PT, 35, 38, 71PT, 76PT, 92PT, 93PT
- Secuencia 11: (PQSH)QP(QE)Q(QE)(LF)(PS)Q (SEQ ID NO: 1584)
 Péptido de respuesta óptima: QQPQFPFPQPPQFPFPQ (SEQ ID NO: 1585)
 Péptido de alta calidad: GFFPQPEQFPFPQ (SEQ ID NO: 1586)

ES 2 648 792 T3

- Grupos incluidos: 17, 25, 36, 40, 41, 80, 88
- Secuencia 12: P(FW)(SP)(EQ)Q(EQT)QP(VILSF) (SEQ ID NO: 1587)
 Péptido de respuesta óptima: QQQQPPFSQQQQPVLPQQSP (SEQ ID NO: 1588)
 (similar a pero más activo que PFSQQQSF en WO 02/083722)
 PSGQVQWPEQQQPPFPQQP (SEQ ID NO: 1589)
 Péptido de alta calidad: GQPPFSEQEQPVLPQG (SEQ ID NO: 1590)
 Grupos incluidos: 18, 79, 84PT, 97, 102PT, 103PT, 115
- Secuencia 13: (IL)QP(QE)QFPQ (SEQ ID NO: 1591)
 Péptido de respuesta óptima: FTQPQQPTPIQPQQPFPQQP (SEQ ID NO: 1592)
 (similar a pero más activo que IIQPQQPAQ en WO 02/083722)
 Péptido de alta calidad: GOQQFIQPEQFPQQG (SEQ ID NO: 1593)
 Grupos incluidos: 19 (PARTE), 26, 30, 58
- Secuencia 14: QQP(EQ)LPFPQ (SEQ ID NO: 1594)
 Péptido de respuesta óptima: QQPQQPFPQPQQPQLPFPQQ (SEQ ID NO: 1595)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 21, 64
- Secuencia 15: QPQQP(EQ)LPF (SEQ ID NO: 1596)
 Péptido de respuesta óptima: QQPQQPFPQPQQPQLPFPQQ (SEQ ID NO: 1597)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 21
- Secuencia 16: PQP(EQ)QP(EQ)LP (SEQ ID NO: 1598)
 Péptido de respuesta óptima: QQPQQPFPQPQQPQLPFPQQ (SEQ ID NO: 1599)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 21
- Secuencia 17: VFLQQQCSPV (SEQ ID NO: 1600)
 Péptidos de respuesta óptima:
 GRUPO 28: SVLQQLNPCKVFLQQQCESHV (SEQ ID NO: 1601)
 GRUPO 122: CKVFLQQQCSPVAMPQRLAR (SEQ ID NO: 1602)
 GRUPO 114: KVFLQQQCSPVAIPYRLARS (SEQ ID NO: 1603)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 28, 114, 122
- Secuencia 18: (M)(WL)(QW)QSSCHVMQ (SEQ ID NO: 1604)
 Péptidos de respuesta óptima:
 GRUPO 39: PQLARSQMWWQSSCHVMQQ (SEQ ID NO: 1605)
 GRUPO 110: ARSOTLWQSSCHVMQCCR (SEQ ID NO: 1606)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 39, 110
- Secuencia 19: QPQQQLAH (SEQ ID NO: 1607)
 Péptido de respuesta óptima: QQPQQQLAHGTFLOPHQIA (SEQ ID NO: 1608)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 31
- Secuencia 20: FPLQPQP(FL)PQ (SEQ ID NO: 1609)
 Péptido de respuesta óptima: PQLQQPFPQPQQPFPQQP (SEQ ID NO: 1610)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 33
- Secuencia 21: FPP(QE)(LQ)PYPQ (SEQ ID NO: 1611)
 Péptido de respuesta óptima: PQPFPPELPYPQPFPFPQQ (SEQ ID NO: 1612)
 Péptido de alta calidad: PQPFPFPQLPYPQPQS, (SEQ ID NO: 1613)
 GQQQFPPEQPYPQQG (SEQ ID NO: 1614)
 Grupos incluidos: 37, 52, 71, 92PT, 93PT, 105

Secuencia 22: LCC(QE)(HQR)L(PW)(QE)IP (SEQ ID NO: 1615)
 Péptido de respuesta óptima: QSTYQPLQQQLCCQQLWQIPE (SEQ ID NO: 1616)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 39PT,100,104,107,178

Secuencia 23: P(WLS)(QL)(QE)QPL(PQ)(PQ) (SEQ ID NO: 1617)
 Péptido de respuesta óptima: ERPWQEQLPPQHTLFPQQQ (SEQ ID NO: 1618)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 44,78,90,95PT,98,116,117,113

Secuencia 24: QPLP(QE)QPSF (SEQ ID NO: 1619)
 Péptido de respuesta óptima: PPFQQQQQLPQQPSFSQQ (SEQ ID NO: 1620)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 45,95PT

Secuencia 25: PF(SP)QQQQP(LVI) (SEQ ID NO: 1621)
 Péptido de respuesta óptima: PPFQQQQQLPQQPSFSQQ (SEQ ID NO: 1622)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: : 45 PARTE

Secuencia 26: IVYSTILQE (SEQ ID NO: 1623)
 Péptido de respuesta óptima: QQSRYEAIRAIVYSTILQE (SEQ ID NO: 1624)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 46

Secuencia 27: PFSQ(QE)QP(IS)(LF)S (SEQ ID NO: 1625)
 Péptido de respuesta óptima: FSQQQPPFSQQQPILSQQPP (SEQ ID NO: 1626)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 47 PARTE,68

Secuencia 28: QGIQILRPL (SEQ ID NO: 1627)
 Péptido de respuesta óptima: QEQQQGIQILRPLFQLVQGG (SEQ ID NO: 1628)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 48

Secuencia 29: PFSSVVAGI (SEQ ID NO: 1629)
 Péptido de respuesta óptima: CSIIKAPFSSVVAGIGGQYR (SEQ ID NO: 1630)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 49

Secuencia 30: YCSTTIAPV (SEQ ID NO: 1631)
 Péptido de respuesta óptima: YIPPYCSTTIAPVGFGTN (SEQ ID NO: 1632)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 50

Secuencia 31: HVAMSQRLA (SEQ ID NO: 1633)
 Péptido de respuesta óptima: : QQCSHVAMSQRLARSQMWWQ (SEQ ID NO: 1634)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 51

Secuencia 32: YSIILQ(QE)(QE)(QE)QGF (SEQ ID NO: 1635)
 Péptido de respuesta óptima: RYDAICAITYSIILQEQQQG (SEQ ID NO: 1636)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: : 53

Secuencia 33: FPHQPQEQAFFPQ (SEQ ID NO: 1637)
 Péptido de respuesta óptima: . QQIFPQPQQTFFPHQPQAFF (SEQ ID NO: 1638)
 Péptido de alta calidad: GQTFPHQPQEQAFFQPG (SEQ ID NO: 1639)
 Grupos incluidos: : 67

ES 2 648 792 T3

Secuencia 34: PS(GS)(OE)V(QE)WPQ (SEQ ID NO: 1640)
 Péptido de respuesta óptima: ATANMQADPSGQVQWPOQQP (SEQ ID NO: 1641)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 81,102PT

Secuencia 35: GALCSSLSN (SEQ ID NO: 1642)
 Péptido de respuesta óptima: FDEEKNSTGALCSSLSNQAS (SEQ ID NO: 1643)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 82

Secuencia 36: QFP(QE)Q(QE)IPV (SEQ ID NO: 1644)
 Péptido de respuesta óptima: QPPFPQQHQQFPQQQIPVVQ (SEQ ID NO: 1645)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 83

Secuencia 37: P(FY)P(QE)QP(YF)PQ (SEQ ID NO: 1646)
 Péptido de respuesta óptima: QQFPQQPYPQQPYPSPQPY (SEQ ID NO: 1647)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 96

Secuencia 38: QAGQG(QE)(QE)GY (SEQ ID NO: 1648)
 Péptido de respuesta óptima: GQQAGQGQGGYYPTSPQQLG (SEQ ID NO: 1649)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 101

Secuencia 39: TLPSMCNVY (SEQ ID NO: 1650)
 Péptido de respuesta óptima: FEEIRNLALQTLPSMCNVYI (SEQ ID NO: 1651)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 106

Secuencia 40: FQPSQ(QE)NPQ (SEQ ID NO: 1652)
 Péptido de respuesta óptima: QQYPSGQGGFFQPSQQNPQAQ (SEQ ID NO: 1653)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 109

Secuencia 41: IRSLVLKTL (SEQ ID NO: 1654)
 Péptido de respuesta óptima: QPQQPAQLEGIRSLVLKTL (SEQ ID NO: 1655)
 Péptido de alta calidad: NO
 Grupos incluidos: 119,120,121

Figura 7

Secuencia Gliadina	SEQ ID NO:	Péptido alta calidad	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1,2	1656	QLQPFQ <u>Q</u> QLPYQPQP	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3,4	1657	GQQPFQPEQPFQWQG	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3,4	1658	GQQPFQPEQPIPVQG	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3,4	1659	GQQPFQPEQPFQWQG	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
5	1660	GFPQTQQPEQPFQWQG		Y	Y				Y	Y		Y
5	1661	GFPQTQQPEQPFQWQG		Y	Y				Y	Y		Y
6	1662	GQPFPEQPPQPFQWQG								Y		
7	1663	PQPQFLLPQLPYQPQS	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
11	1664	GFFPQPEQEFPQWQG		Y	Y	Y	Y		Y			Y
11	1665	GFFPQPEQEFPQWQG		Y	Y	Y	Y		Y			Y
12	1666	GQPFSEQEPVLPQG					Y		Y		Y	
12	1667	GQPFSEQEPVLPQG					Y		Y		Y	
13	1668	GQQQFIQPEQPFQWQG		Y	Y	Y		Y	Y	Y		Y
21	1669	PQPQFLLPQLPYQPQS	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
21	1670	GQQQPFPEQPYQWQG		Y	Y						Y	Y
33	1671	GQTFHQPEQAFQWQG		Y	Y				Y		Y	Y

Figura 8

Avenina 20mero	SEQ ID NO:	Secuencia(s) núcleo previstas	SEQ ID NO:	Lambda	Proporción
TTTVQYDPSEQYQPYPEQQQ	1672	DPSEQYQPY	1684	33,58	0,145
QFDPSEQYQPYPEQQQPILQ	1673	PYPEQQQPI DPSEQYQPY	1685 1686	122,34	0,103
*VQYDPSEQYQPYPEQQQPFV	1674	PYPEQQQPF DPSEQYQPY	1687 1688	122,34	0,105
TVQYNPSEQYQPYPEQQEPP	1675	PYPEQQEPP DPSEQYQPY	1689 1690	146,42	0,051
YQPYPEQQQPILQQQQMLLQ	1676	PYPEQQQPI	1691	52,56	0,126
EQYQPYPEQQQPFVQQQPPF	1677	PYPEQQQPF	1692	90,39	0,053
SEQYQPYPEQQPFMQPLLQ	1678	PYPEQQPFM	1693	19,07	0,226
*CRRLEQIPEQLRCPAIHSVV	1679	RRLEQIPEQ	1694	61,47	0,069
*QIPEQLRCPAIHSVVQAIL	1680			94,84	0,033
*NNKREQQFGQIFSGFSVQL	1681			104,78	0,077
*QILRQAICQVTRQCCRQLA	1682			34,01	0,055
*VPFLRSQILRQSTCHVMRRQ	1683			92,47	0,067

Secuencia 1: PYPEQ(QE)QP(IF)(VLM) (SEQ ID NO:1695)
 Péptido de respuesta óptima: QFDPSEQYQPYPEQQQPILQ (SEQ ID NO:1696)
 Péptido de alta calidad: NO
 POTENCIA: 6/30 RESPONDEDORES, TASA DE RESPUESTA 122,3
 (HOMÓLOGO A TRIGO Secuencia 12: GQPPFSEQEQPVLPOG (SEQ ID NO:1590))

Secuencia 2: CRRLEQIPEQLRCPAIHSVV (SEQ ID NO:1697)

Secuencia 3: QFGQIFSGFSVQLLSEALG (SEQ ID NO:1698)
 POTENCIA: 12/30 RESPONDEDORES, TASA DE RESPUESTA 11,2

Figura 10

VRVPVPQLQP QNPSQQQPQE QVPLVQQQQF PGQQQQFPPQ
 QPYQPQPPF SQQPYLQLP FPQPQLPYPQ PQSFPPQQPY
 PQQPQYSQP QQPISQQQAQ QQQQQQQQQQ QQQILQQILQ
 QQLIPCMDVV LQQHNIHAR SQVLQQSTYQ LLQELCCQHL
 WQIPEQSQCQ AIHNVVHAI LHQQQKQQQ PSSQVSFQQP
 LQQYPLGQGS FRPSQQNPOA QGSVQPQQLP QFEEIRNLAL
 QTLPAMCNVY IAPYCTIAPF GIFGTN (SEQ ID NO: 1928)

Figura 9

Grupo	Epítomos "núcleo(s)" previstos	SEQ ID NO:	Secuencias	SEQ ID NO:	Respuesta (SFC)	
					A	B
1	QQPTPIQPQ	1699	PFTQPQQPTPIQPQQPFPQQ	1722	70	18
2	QQPFPQQPQ o QQPFPWQPQ o QQPFPQSQQ	1700 1701 1702	QQQFTQPQQPFPQQPQQTYP	1723	57	21
			PFPQQPQQPFPQQPQQSFPQ	1724	53	23
			TPIQPQQPFPQQPQQPQQPF	1725	64	16
			QTQQPQQPFPQQPQQPFPQT	1726	52	17
			QQFLQPQQPFPQQPQQPYPQ	1727	44	16
			PQQPFPQQPQQPQQPFPQQPQ	1728	51	14
			QQPFPQQPQQPFPQQPQQPIF	1729	81	10
			PQQPFLQPQQPFPQQPQQPF	1730	45	9
			QFPQPQQPFPWQPQQPFPQ	1731	19	8
			QPQQPFPQSQQPQQPFPQQPQ	1732	41	15
PQTQQPQQPFPQSQQPQQPF	1733	36	9			
3	QQPFPQLQPQ o QQPFPQLQQ	1703 1704	SEQIIPQQLQPFPQLQPQQP	1734	12	3
			PFPQTQQPQQPFPQLQPQQP	1735	25	13
4	QQPIPVPQPQ o QQPIPQQPQ o QQPYPQQPQ	1705 1706 1707	QPQQPIPVQPQQSFPQQSQ	1736	60	12
			FPELQQPIPVQPQQPFPQLQP	1737	22	7
			FPPQQPQQPYPQQPQQPFPQT	1738	19	4
			PRQPFPQQPQQPYPQQPQQP	1739	19	13
5	PQQPQQSFPQQQ o PQQPQQPFPQQQ	1708 1709	PFPQPQQPQQSFPQQQQPLI	1740	29	15
			LPQPQQPQQSFPQQQRPFIQ	1741	37	12
			QPQQPQQPFPQQQQPLIQPY	1742	49	17
6	QGSFQPSQQ	1710	QPQQQYPSGQGSFQPSQQNP	1743	54	5
			QYPSSQGSFQPSQQNPQAQG	1744	32	7
			GQGFQPSQQNPQAQGSFQP	1745	7	3
7	PQQPFPQPQQ o PQQPFPQTQQ o	1711 1712	PQTQQPQQPFPQPQQTFPQQ	1746	21	9
			QQPQQPFPQPQLPFPQQSEQ	1747	15	2
			FPWQPQQPFPQTQQSFPQLQP	1748	25	7
8	QQPQQPFPQ o QQPQQPYPQ	1713 1714	PFPQTQQPQQPFPQLQPQQP	1749	25	13
			QQPLPQPQQPQQPFPQSQQP	1750	54	20
			PFPQLQQPQQPFPQPQQQLP	1751	36	5
			PRQPFPQQPQQPYPQQPQQP	1752	19	13
9	PFPQPQQPQ o PFPQSQQPQ o PFPQPQQAQ o QFPQTQQPQ	1715 1716 1717 1718	PQQPFPQPQQPFPQLQQ	1753	37	8
			PQTQQPQQPFPQSQQPQQPF	1754	36	9
			QPQQPFPQSQQPQQPFPQPQ	1755	41	15
			PQQPQQPFPQPQQALPFPQ	1756	16	7
			HQPQQQFPQTQQPQQPFPQP	1757	30	14
10	PQQQFIQPQ	1719	FSQPQQPQQQFIQPQQPFPQ	1758	45	8
11	QQPQLPFPQ o LQPQQPFPQ	1720 1721	PQPQQPQLPFPQQPQQPFPQ	1759	79	7
			PQQQFLQPQQPFPQQPRQPY	1760	35	14
12			QTLPAMCNVYIPPHCSTTIA	1761	35	7
13			NPSQQPQEQVPLVQEQQFQ	1762	5	16
14			HHFRSNSNHFHSNNNQFYR	1763	14	3