



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120746** (13) **C2**  
(51) МПК (2020.01)**A61K 39/00****C07K 14/72** (2006.01)**C07K 7/08** (2006.01)**A61P 5/16** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2016 02098</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Рейт Девід (GB)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>06.08.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЕПІТОП ІНТЕРНЕТШНЛ НВ,</b> Campus Diepenbeek, Agoralaan, B-3590 Diepenbeek, Belgium (BE)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.02.2020</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.</b> <b>№367</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>1314052.0</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007057778 A2, 24.05.2007 WO 0216410 A2, 28.02.2002 Hidefuni Inaba et al. Immune response of mice transgenic for human histocompatibility leucocyte antigen-DR to human thyrotropin receptor-extracellular domain. Thyroid, 209, vol. 19, no. 11, p. 1271-1280 WO 2010133834 A2, 25.11.2010 FR 2842812 A1, 30.01.2004 Tandon N. et al. T cell responses to synthetic TSH receptor peptides in Graves' disease. Clinacal and experimental immunology, 1992, vol. 89, no. 3, p. 468-473 Jacobson Eric M. et al. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. Journal of autoimmunity, 2008, vol. 30, no. 1-2, p. 58-62
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>06.08.2013</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>GB</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>24.06.2016, Бюл.№ 12</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.02.2020, Бюл.№ 3</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>РСТ/IB2014/063739,</b> <b>06.08.2014</b>	

**(54) ПЕПТИД, ЯКИЙ ЗДАТНИЙ ДО ЗВ'ЯЗУВАННЯ З МОЛЕКУЛОЮ МНС IN VITRO****(57) Реферат:**

Винахід стосується пептиду, який вибирають з пептидів рецептора тиреотропного гормону (ТТГР), та який здатний до зв'язування з молекулою МНС *in vitro* і може бути представлений Т-клітинам без процесингу антигену: Винахід також стосується композиції, яка включає множину пептидів, застосування пептиду для виготовлення лікарського засобу для пригнічення або запобігання продукуванню ТТГР аутоімунних антитіл *in vivo*, та застосування пептиду в лікуванні і/або профілактиці хвороби Грейвса у суб'єкта.

UA 120746 C2



## ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується пептидів, щонайменше частина яких одержана з рецептора гормону, що стимулює діяльність щитовидної залози (тут і далі тиреотропного гормону) (ТТГР). Зазначені пептиди можуть бути корисні для профілактики і/або лікування хвороби Грейвса (ХГ).

### 5 ВІДОМИЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Хвороба Грейвса характеризується гіперактивністю щитовидної залози, результатом якої є продукування надлишкової кількості тиреоїдного гормону і збільшення щитовидної залози (зоб). Виникаючий стан гіпертиреозидизму може стати причиною широкого кола нейрофізіологічних і фізичних симптомів. Хвороба Грейвса є найбільш загальним випадком гіпертиреозидизму (60-90 % із усіх випадків) і звичайно виявляє себе в середньому віці, але також зустрічається у дітей, підлітків і осіб похилого віку. Вона уражає аж до 2 % жіночого населення і зустрічається в п'ять-десять разів частіше у жінок, ніж у чоловіків. Педіатрична хвороба Грейвса уражає близько 6000 дітей у США і 6000 дітей у Європі. ХГ є також найбільш частою причиною важкого гіпертиреозидизму, що супроводжується більш вираженими клінічними ознаками і симптомами і лабораторними аномаліями в порівнянні з менш важкими формами гіпертиреозидизму.

3 з хворобою Грейвса пов'язаний сильний спадковий компонент. На даний час не існує популяційних досліджень відносно ХГ, однак існує декілька квазіпопуляційних досліджень гіпертиреозидизму, і усі вони лише приблизно оцінюють частоту виникнення і переважання хвороби Грейвса. Число випадків гіпертиреозидизму варіюється від 26:100000 до 93:100000 і повне їх переважання оцінюють як 1,3 %, причому 42 % випадків є клінічно вираженими і 62 % є субклінічними.

Близько 30-50 % людей із ХГ також будуть страждати офтальмопатією Грейвса (ОГ), екзофтальмом одного або обох очей. Множина випадків ОГ є помірними і локальними, однак у 20 % випадків являють собою суттєве/помірне до важкого захворювання, причому щонайменше половина з них вимагає використання стероїдів, і 3-5 % з пацієнтів з ОГ мають захворювання з больовим синдромом, що загрожує втратою зору, з дистиреоїдною оптичною невротією (ДОН). Випинання очей може стати причиною сильної сухості рогівки, оскільки віка очей не здатні закриватися вночі. Підвищений тиск очного нерва може привести до дефектів зорового поля і до втрати зору. ОГ також може бути пов'язана з обмеженою мікседемою шкіри.

Усі симптоми й ознаки ХГ віртуально виникають із прямих і непрямих ефектів гіпертиреозидизму, причому основними виключеннями є ОГ, зоб і обмежена мікседема шкіри. Симптоми гіпертиреозидизму можуть включати безсоння, тремор рук, гіперактивність, випадання волосся, надлишкову пітливість, непереносимість тепла і втрату маси, незважаючи на підвищений апетит. Додатковими ознаками найчастіше є дифузно збільшена (звичайно симетрично) нечутлива щитовидна залоза, ретракція верхнього віка, надлишкова слюзоточивість, викликана офтальмопатією Грейвса, серцева аритмія і гіпертонія. Тиреотоксичні пацієнти можуть мати поведінкові і персональні зміни, такі як психози, збудження і депресія. У випадку помірного гіпертиреозидизму пацієнти можуть мати менш очевидні прояви, наприклад тривогу, занепокоєння, дратівливість і емоційну лабільність.

На даний час не існує способів лікування ХГ, і існуючі на даний час способи лікування, тому, спрямовані на виявлені симптоми. Існують три способи лікування ХГ: оральні антитиреозидні лікарські засоби (АТЛЗ), радіоактивний йод (РАЙ) і видалення щитовидної залози. Два останніх підходи приводять до необхідності протягом життя додатково приймати тиреоїдні гормони. У Сполучених Штатах найбільше часто використовують лікування радіоактивним йодом, тоді як у Європі, Японії й у більшості інших країн застосовують у першу чергу АТЛЗ.

АТЛЗ-терапія пов'язана з деякими рідкими побічними ефектами, і відсоток пацієнтів з клінічною ремісією досягає 50-60 %.

Росте розуміння того, що метод РАЙ може викликати або ускладнити активну ОГ, і число пацієнтів, яких лікують АТЛЗ, у Сполучених Штатах зростає.

Через змінні успіхи кожного зі способів лікування, пацієнтів часто піддають більше ніж одному способу лікування, якщо не доведено, що перші спроби лікування виявилися повністю успішними. Ризик рецидиву і наступного гіпотиреозидизму є суттєвим, і загальна ефективність доступних способів лікування ХГ далека від бажаної. Таким чином, існує необхідність в альтернативних способах лікування ХГ, які були б ефективні при лікуванні ХГ і ослабляли б або зменшували симптоми захворювання.

### ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1. Імуногенність RNB-5 у DR3-мишей. Мишей (N=2 самці; N=2 самки) примують RNB-5, і через 10 днів LN-клітини (об'єднані по гендерній ознаці) і спленоцити культивують з різними концентраціями пептиду і вимірюють Т-клітинну проліферацію. Індеси стимуляції (ІС) являють

собою відношення включення тимідину в стимульованій пептидом культурі до включення тимідину в нестимульованій культурі. F - самки; M - самці; LN - лімфатичні вузли.

Фіг. 2. Ідентифікація апітопів у RNB-5. DR3-мишей імунізують RNB-5/CFA і створюють гібридоми.  $5 \times 10^4$  ТТГР-специфічних гібридомних клітин культивують з  $5 \times 10^4$  свіжими (зафарбовані прямокутники) або фіксованими (порожні прямокутники) VAVY-клітинами і 25 мкг/мл антигену (RNB-5 або RNB-5 вкладені пептиди). Показано представницькі клони. Через 48 годин вимірюють продукування антигеніндукованих IL-2. Графік зображує середнє з дублікатних вимірювань, і результати представлені з 2 незалежних експериментів. АПК - антигенпредставляючі клітини.

Фіг. 3. Ідентифікація апітопів у RNB-5. DR4-мишей імунізують ТТГР/CFA і створюють гібридоми.  $5 \times 10^4$  ТТГР-специфічних гібридомних клітин культивують з  $5 \times 10^4$  свіжими (зафарбовані прямокутники) або фіксованими (порожні прямокутники) BM14-клітинами і 25 мкг/мл антигену (ТТГР, RNB-5 або RNB-5 вкладені пептиди). Зображено представницькі клони. Через 48 годин вимірюють продукування антигеніндукованих IL-2. Графік являє собою середнє з дублікатних вимірювань. АПК - антигенпредставляючі клітини.

Фіг. 4А. Ідентифікація апітопів у RNB-4. DR4-мишей імунізують ТТГР/CFA і створюють гібридоми.  $5 \times 10^4$  ТТГР-специфічних гібридомних клітин культивують з  $5 \times 10^4$  свіжими (зафарбовані прямокутники) або фіксованими (порожні прямокутники) BM14-клітинами і 25 мкг/мл антигену (ТТГР, RNB-4 або RNB-4 вкладеного пептиду). Зображено представницькі клони. Через 48 годин вимірюють продукування антигеніндукованих IL-2 і представляють як значення OD. Графік являє собою середнє з дублікатних вимірювань, і результати представляють 3 незалежні вимірювання. АПК - антигенпредставляючі клітини.

Фіг. 4В. Ідентифікація апітопів у RNB-4. DR4-мишей імунізують ТТГР/CFA і створюють гібридоми.  $5 \times 10^4$  ТТГР-специфічних гібридомних клітин культивують з  $5 \times 10^4$  свіжими (зафарбовані прямокутники) або фіксованими (порожні прямокутники) BM14-клітинами й антигеном (25 ТТГР із RNB-4; 100 мл RNB-4 вкладеного пептиду). Через 48 годин вимірюють продукування антигеніндукованих IL-2 і представляють як OD-значення.

Фіг. 5. Протокол ex vivo толеризації. А) Мишам підшкірно вводять у потиличну частину шиї 100 мкг пептиду в дні -8, -6 і -4 (схема високих доз). У день 0, мишам підшкірно вводять у основу хвоста RNB-5/CFA. В) Мишам підшкірно вводять у потиличну частину шиї 0,1 мкг, 1 мкг і 10 мкг пептиду в дні -15, -13 і -11, з наступними трьома ін'єкціями 100 мкг пептиду в дні -8, -6 і -4 (схема збільшуваних доз). У день 0, мишам підшкірно вводять у основу хвоста ТТГР/CFA або пептид/CFA. В обох схемах мишей умертвляють через 10 днів після імунізації для вимірювання проліферації LN-клітин і спленоцитів після повторної стимуляції ТТГР.

Фіг. 6. Ex vivo толерантність, індукована RNB-5-апітопами. Мишей попередньо обробляють, використовуючи RNB-5-апітопи за схемою високих доз (А-В) або за схемою збільшуваних доз (С-F). Результати представляють як середнє $\pm$ SEM значення IC для PBS-оброблених мишей (чорні лінії) і для оброблених пептидом мишей (червоні лінії). Графіки А, В, С, Е і F представляють результати експериментів, здійснених на DR3-мишах, графік D представляє експеримент, здійснений на DR4-мишах. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA використовують для визначення ефектів повної обробки відносно Т-клітинної проліферації, і на графіках зазначені р-значення. Використовують пост-хок тестування Бонферроні, і значимі відмінності зазначені на графіках (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). SI - індекс стимуляції; LN - лімфатичні вузли.

Фіг. 7. Індукування ex vivo толерантності з використанням RNB-9-пептидів. DIG-мишей попередньо обробляють згідно зі схемою збільшуваних доз, використовуючи RNB-9B (А, С) або RNB-9C (В, D). Результати представляють як середнє $\pm$ SEM зі значень IC для PBS-оброблених мишей (чорні лінії) і оброблених пептидом мишей (червоні лінії). Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA використовують для визначення впливу повних ефектів обробки відносно Т-клітинної проліферації, і р-величини зазначені на графіках. Використовують пост-хок тестування Бонферроні, і значимі відмінності зазначені на графіках (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). SI - індекс стимуляції; LN - лімфатичні вузли.

Фіг. 8. Рівні ТТГР антитіл (повний IgG), визначені за допомогою ELISA. Мишей імунізують один раз (група А+В) або двічі (група С), використовуючи 50 мкг ТТГР в ад'юванті. OD-значення представлені для групи як середнє $\pm$ SEM.

Фіг. 9. Рівні сироватки Т4 у LacZ-Ad і Ad-ТТГР-Ad імунізованих мишей. Результати представлені як індивідуальні значення для мишей з різних груп до (А), через 4 тижні після (В) і через 10 тижнів після (С) першої імунізації. Зазначено число гіпертиреоїдних особин відносно повного числа для кожної групи. Мишей визнають хворими гіпертиреоїдизмом, коли у них рівні Т4 перевищують середнє+2SD для значень Т4 у сироватці у LacZ-Ad імунізованих мишей.

Середні рівні Т4 суттєво не відрізняються для мишей, яким вводять ТТГР-Ad і LacZ-Ad через 4 або 10 тижнів. Однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, пост-хок тестування Бонферроні,  $p < 0,05$  визнають значною відмінністю.

Фіг. 10. Рівні анти-ТТГР антитіл (повний IgG, ELISA) у LacZ-Ad і ТТГР-Ad імунізованих мишей. Результати представлені як індивідуальні значення для мишей з різних груп до (А), через 4 тижні після (В) і через 10 тижнів після (С) першої імунізації. Статистичний аналіз здійснюють, використовуючи однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA і пост-хок тестування Бонферроні. Значимі відмінності зазначені на графіках (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Фіг. 11. Реакція ТТГР- і RNB-5-специфічних гібридомних клонів, виділених з HLA-DR3- або HLA-DR4-мишей, імунізованих ТТГР/CFA, на RNB-5D-модифіковані пептиди. Гібридомні клони (представлені різними кольорами) культивують зі свіжими АПК і 25 мкг/мл антигену протягом 48 годин до визначення продукування IL-2. Заміна амінокислот у центральних ділянках RNB-5D-GKK або RNB-5D-KKK хамперами розпізнавання гібридомними клонами свідчить про те, що зазначені амінокислоти є важливими в епітопній ділянці.

Фіг. 12. Реакція ТТГР- і RNB-5-специфічних гібридомних клонів, виділених з HLA-DR3- або HLA-DR4-мишей, імунізованих ТТГР/CFA, на RNB-5D-модифіковані пептиди. Гібридомні клони (представлені різними кольорами) культивують зі свіжими (зафарбовані прямокутники) або фіксованими (порожні прямокутники) АПК і 25 мкг/мл антигену протягом 48 годин до визначення продукування IL-2.

Фіг. 13. Реакція ТТГР- і RNB-5-специфічних гібридомних клонів, виділених з HLA-DR3- або HLA-DR4-мишей, імунізованих ТТГР/CFA, на RNB-5D-модифіковані пептиди. Гібридомні клони (представлені різними кольорами) культивують зі свіжими АПК і 25 мкг/мл антигену протягом 48 годин до визначення продукування IL-2.

Фіг. 14. Реакція ТТГР- і RNB-5-специфічних гібридомних клонів, виділених з HLA-DR3- або HLA-DR4-мишей, імунізованих ТТГР/CFA, на RNB-5D-модифіковані пептиди. Гібридомні клони (представлені різними кольорами) культивують з фіксованими АПК і 25 мкг/мл антигену протягом 48 годин до визначення продукування IL-2.

Фіг. 15. Реакція ТТГР- і RNB-5-специфічних гібридомних клонів, виділених з HLA-DR3- або HLA-DR4-мишей, імунізованих ТТГР/CFA, на RNB-5D-модифіковані пептиди. Гібридомні клони (представлені різними кольорами) культивують зі свіжими і фіксованими АПК і 25 мкг/мл антигену протягом 48 годин до визначення продукування IL-2.

Фіг. 16. Ex vivo індукування толерантності з використанням RNB4K-GKK у DR4-мишей згідно зі схемою збільшення дози. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA використовують для визначення впливу повних ефектів обробки на Т-клітинну проліферацію, і р-значення представлені на графіках. Використовують пост-хок тестування Бонферроні, і значимі відмінності зазначені на графіках (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) Результати являють собою середнє $\pm$ SEM для PBS-оброблених (чорні лінії) і оброблених пептидом мишей (червоні лінії). SI - індекс стимуляції; LN - лімфатичні вузли.

Фіг. 17. Ідентифікація RNB12-ділянки по реактивності Т-клітинної лінії, одержаної від пацієнтів із хворобою Грейвса. Т-клітинну лінію створюють шляхом стимуляції виділених МКПК (PBMCs-мононуклеарних клітин периферичної крові) від пацієнта з хворобою Грейвса з використанням RNB12 протягом 12 днів. Після додаткового циклу повторного стимулювання в 12 днів, RNB12-специфічні Т-клітини тестують відносно розпізнавання індивідуальних вкладених пептидів у RNB12 ділянці. SI - індекс стимуляції.

Фіг. 18. Ідентифікація апітопів у RNB12-ділянці з використанням RNB12-специфічних TCL, одержаних від здорового донора. RNB12-специфічні Т-клітини культивують з BM14, людською клітинною лінією, експресуючою людські молекули МНС класу II у присутності пептиду. Зафарбовані прямокутники являють собою стимуляцію в присутності свіжих, але опромінених BM14-клітин, і порожні прямокутники - у присутності фіксованих АПК (див. розділ матеріали і методи). Перед додаванням до культур 3H-тимідину, надосадову культуральну рідину збирають і заморожують. Надосадову рідину аналізують на присутність IFN-гамма (А) для підтвердження проліферативної реакції (В) Т-клітин. TCL-Т-клітинна лінія; АПК - антигенпредставляючі клітини; МНС клас II - головний комплекс гістосумісності класу II; SI - індекс стимуляції; OD - оптична густина.

Фіг. 19. Приклади ex vivo толерантності, індукованої RNB5D-модифікованими пептидами у DR3-мишей згідно зі схемою збільшуваних доз. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA використовують для вимірювання впливу повних ефектів обробки на Т-клітинну проліферацію, і р-значення зазначені на графіках (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Результати представляють середнє $\pm$ SEM для PBS оброблених (чорні лінії) і пептидом оброблених мишей (червоні лінії). SI - індекс стимуляції. А: RNB5D-K1; В: RNB5D-K3; С: RNB5D-K16.

Фіг. 20. Графік, що ілюструє статуси апітопів RNB-5D-модифікованих пептидів. Приклад реакції ТТГР- і RNB-5-специфічних гібридомних клонів, виділених з HLA-DR3- і HLA-DR4-мишей, імунізованих ТТГР/СFА, на RNB-5D-модифіковані пептиди. Гібридомні клони культивують зі свіжими (зафарбовані прямокутники) і фіксованими (порожні прямокутники) АПК і 25 мкг/мл антигену протягом 48 годин до визначення продукування ІL-2.

#### УЗАГАЛЬНЕННЯ АСПЕКТІВ ДАНОГО ВИНАХОДУ

Автори даного винаходу ідентифікували ряд пептидів, одержаних із ТТГР, що є ефективними для профілактики і/або лікування ХГ.

У першому аспекті в даному винаході запропонований пептид, який здатний до зв'язування з молекулами МНС *in vitro* і може бути представлений Т-клітинам без процесингу антигену і який включає всі або частину з наступних пептидів рецепторів тиреотропного гормону (ТТГР):

RNB\_5: ISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHI (SEQ ID NO: 1),

RNB\_4: LRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLE (SEQ ID NO: 2),

RNB\_9: TGLKMFPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM (SEQ ID NO: 3),

RNB\_12: LTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYL (SEQ ID NO: 64).

Зазначений пептид можна вибрати з наступних ТТГР-пептидів і їх похідних:

RNB\_5D-GKK: KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 12),

RNB\_5D-KKK: KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 21),

RNB\_5E-GKK: KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 13),

RNB\_5A: ISRIYVSIDVTLQQLE (SEQ ID NO: 6),

RNB\_5B: SRIYVSIDVTLQQLE (SEQ ID NO: 7),

RNB\_5C: RIYVSIDVTLQQLES (SEQ ID NO: 8),

RNB\_5D: IYVSIDVTLQQLESH (SEQ ID NO: 9),

RNB\_5E: YVSIDVTLQQLESHS (SEQ ID NO: 10),

RNB\_5F: VSIDVTLQQLESHSF (SEQ ID NO: 11),

RNB\_5F-GKK: KKGVSIDVTLQQLESHSFGKK (SEQ ID NO: 14),

RNB\_4J-GKK: KKGSNLPNISRIYVSIDVGKK (SEQ ID NO: 16),

RNB\_4J: SNLPNISRIYVSIDV (SEQ ID NO: 15),

RNB\_4K: NLPNISRIYVSIDVT (SEQ ID NO: 62),

RNB\_4K-GKK: KKGNLPNISRIYVSIDVTGKK (SEQ ID NO: 63),

RNB\_9A: TGLKMFPDLTKVYST (SEQ ID NO: 17),

RNB\_9B: GLKMFPDLTKVYST (SEQ ID NO: 18),

RNB\_9C: LKMFPDLTKVYSTDI (SEQ ID NO: 19),

RNB\_9D: KMFPDLTKVYSTDI (SEQ ID NO: 20),

RNB\_12A: LTLKLYNNGFTSVQGY (SEQ ID NO: 65),

RNB\_12B: TLKLYNNGFTSVQGY (SEQ ID NO: 66),

RNB\_12B-KKK: KKKTLYNNGFTSVQGYKKK (SEQ ID NO: 67).

Пептид може включати RNB5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F, 4J, 4K, 9A, 9B, 9C, 9D, 12A або 2B послідовності або їх варіанти, у яких одна або більше з амінокислот були замінені іншою амінокислотою, такою як К, що була модифікована по одному або по обох кінцях, наприклад, шляхом введення "GKK" або "KKK" послідовностей.

Пептид може включати RNB-5D послідовність або її варіант, у якій одна або більше з амінокислот були замінені іншою амінокислотою, такою як К, що була модифікована по одному або по обох кінцях, наприклад, шляхом введення "GKK" або "KKK" послідовностей.

У даному винаході також запропонований пептид, що включає послідовність:

KK-(G/K)-aa1-(RNB-5D-пептид)-aa2-aa3-Z-(G/K)-KK,

де aa1 не є амінокислотою, І, К або Т;

RNB-5D-пептид являє собою YVSIDVTLQQLE, або його варіант, у якому одна або більше з амінокислот була замінена К,

aa2 не є амінокислотою, S або К;

aa3 не є амінокислотою, Н або К,

який здатний до зв'язування з молекулою МНС *in vitro* і може бути представлений Т-клітинам без процесингу антигену.

У зазначеному варіанті RNB-5D-пептид може бути YVSIDVTLQQLE, або його варіантом, у якому одна, дві або три амінокислоти замінені на К.

Пептид можна вибрати з наступної групи, у якій усі члени ідентифіковані як апітопи (Таблиця 1):

KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 12), KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO:

22), KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 23), KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO:

24), KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 25), KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 26),

KKGIYVSIDVTLQQKESHGKK (SEQ ID NO: 27), KKGIVVSIDVTLQQKSHGKK (SEQ ID NO: 28), KKGIVVSIDVTLQQLEKHGKK (SEQ ID NO: 29), KKGIVVSIDVTLQQLESGKK (SEQ ID NO: 30), KKGIVVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 31), KKGIVVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 32), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 33), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 34), KKGIVVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 35), KKGIVVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 36), KKGIVVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 37), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 38), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 39), KKGIVVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 40), KKGTYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 41), KKGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 42), KKGTYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 43), KKGTYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 44), KKGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 21), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 47), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 49), KKKIYVSIDVKLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 50), KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 51), KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 52), KKKIYVSIDVTLQQKESHKKK (SEQ ID NO: 53), KKKIYVSIDVTLQQKSHKKK (SEQ ID NO: 54), KKKIYVSIDVTLQQLEKHHKKK (SEQ ID NO: 55), KKKIYVSIDVTLQQLESKKKK (SEQ ID NO: 56), KKKIYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57), KKKIYVSIDVKLQQLEKKK (SEQ ID NO: 58), KKKIYVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 59), KKKIYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60), KKKIYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID NO: 61).

Пептид можна вибрати з наступної групи, у якій усі члени ідентифіковані як апітопи і мають підвищену розчинність:

KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 22), KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 24), KKGIVVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 31), KKGIVVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 32), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 33), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 34), KKGIVVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 35), KKGIVVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 40), KKGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 42), KKGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 49), KKKIYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57), KKKIYVSIDVKLQQLEKKK (SEQ ID NO: 58), KKKIYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60), KKKIYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID NO: 61).

Пептид можна вибрати з наступної групи, у якій усі члени ідентифіковані як апітопи і мають найкращу розчинність:

KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 24), KKGIVVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 32), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 33), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 34), KKGIVVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 35), KKGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 42), KKGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 49), KKKIYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57), KKKIYVSIDVKLQQLEKKK (SEQ ID NO: 58), KKKIYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60), KKKIYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID NO: 61).

Наступні пептиди становлять особливий інтерес:

KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 32), KKGIVVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 34), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48), KKKIYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57), KKKIYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60).

В другому аспекті в даному винаході запропонована композиція, яка включає множину пептидів, включаючи один або більше з пептидів відповідно до першого аспекту даного винаходу.

У третьому аспекті в даному винаході запропонований пептид відповідно до першого аспекту даного винаходу або композиція відповідно до другого аспекту даного винаходу для застосування в пригніченні або запобіганні продукуванню ТТГР аутоімунних антитіл *in vivo*.

У четвертому аспекті в даному винаході запропонований пептид відповідно до першого аспекту даного винаходу або композиція відповідно до другого аспекту даного винаходу для застосування в лікуванні і/або профілактиці хвороби Грейвса у суб'єкта.

У п'ятому аспекті в даному винаході запропоноване застосування пептиду відповідно до першого аспекту даного винаходу або композиції відповідно до другого аспекту даного винаходу для виготовлення лікарських засобів для пригнічення або запобігання продукуванню ТТГР аутоімунних антитіл *in vivo*.

У шостому аспекті в даному винаході запропоноване застосування пептиду відповідно до першого аспекту даного винаходу або композиції відповідно до другого аспекту даного винаходу для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або профілактики хвороби Грейвса.

У сьомому аспекті в даному винаході запропонований спосіб пригнічення або запобігання продукуванню ТТГР аутоімунних антитіл у суб'єкта, який включає стадію введення зазначеному

суб'єкту пептиду відповідно до першого аспекту даного винаходу або композиції відповідно до другого аспекту даного винаходу.

У восьмому аспекті в даному винаході запропонований спосіб лікування хвороби Грейвса у суб'єкта, який включає стадію введення зазначеному суб'єкту пептиду відповідно до першого аспекту даного винаходу або композиції відповідно до другого аспекту даного винаходу.

Суб'єктом може бути HLA-DR3 або HLA-DR4.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ПЕРЕВАЖНОГО ВАРІАНТА ВИНАХОДУ ПЕПТИДИ

У першому аспекті даний винахід стосується пептидів.

Термін "пептид" використовують у звичайному розумінні для позначення ряду залишків, звичайно L-амінокислот, з'єднаних один з одним звичайно пептидними зв'язками між  $\alpha$ -аміно- і карбоксильними групами сусідніх амінокислот. Термін включає модифіковані пептиди і синтетичні пептидні аналоги.

Пептиди даного винаходу можна одержати, використовуючи хімічні методи (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin). Наприклад, пептиди можна синтезувати, використовуючи твердофазні методики (Roberge J.Y. et al. (1995), Science, 269: 202-204), відщеплюючи від смоли й очищаючи за допомогою препаративної високоефективної рідинної хроматографії (e.g., Creighton (1983), Proteins Structures and Molecular Principles, H Freeman and Co, New York NY). Автоматизований синтез можна здійснити, наприклад, використовуючи пептидний синтезатор ABI 431 peptide Synthesizer (Perkin Elmer) відповідно до інструкцій виготовлювача.

Альтернативно, пептид можна одержати, використовуючи рекомбінантні методики або шляхом розщеплення більш довгих поліпептидів. Наприклад, пептид можна одержати, розщеплюючи білок рецептора тиреотропіну, після чого можна модифікувати один або обидва його кінці. Склад пептиду можна підтвердити, використовуючи амінокислотний аналіз або секвенування (наприклад, процедуру розщеплення по Едману).

Для практичних цілей існують різні інші характеристики, які може демонструвати пептид. Наприклад, для того, щоб пептид був терапевтично корисний, важливо, щоб він був достатньо стабільний *in vivo*. Термін напівжиття пептиду *in vivo* може бути щонайменше 10 хвилин, 30 хвилин, 4 години або 24 години.

Пептид може також демонструвати високу біодоступність *in vivo*. Пептид може зберігати конформацію *in vivo*, що забезпечує його зв'язування з молекулами МНС на клітинній поверхні без відповідних ускладнень.

#### АПІТОПИ

При адаптивній імунній реакції Т-лімфоцити здатні розпізнавати внутрішні епітопи білкового антигену. Антигенпредставляючі клітини (АПК) захоплюють білкові антигени і розщеплюють їх на короткі пептидні фрагменти. Пептид може зв'язуватися з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС) класу I або II усередині клітини і може бути перенесений на клітинну поверхню. Якщо антиген представлений на клітинній поверхні в зв'язку з молекулою МНС, такий пептид може бути розпізнаний Т-клітиною (через Т-клітинний рецептор (TCR)), і в такому випадку зазначений пептид є Т-клітинним епітопом.

Таким чином, епітоп являє собою пептид, одержаний з антигену, що здатний до зв'язування з пептидзв'язувальною борозенкою молекули МНС класу I або II і розпізнається Т-клітиною.

Мінімальний епітоп являє собою найбільш короткий фрагмент, одержуваний з епітопа, що здатний до зв'язування з пептидзв'язувальною борозенкою молекули МНС класу I або II і розпізнається Т-клітиною. Для конкретної імуногенної ділянки звичайно можливо створити "вкладений набір" пептидів, що перекриваються, які діють як епітопи, причому усі вони містять мінімальний епітоп, але відрізняються своїми фланкуючими ділянками.

Таким же способом можна ідентифікувати мінімальний епітоп для конкретної комбінації МНС молекула:Т-клітина, вимірюючи реакцію на усічені пептиди. Наприклад, якщо виникає реакція на пептид, який включає залишки 1-15 у бібліотеці, що перекривається, набори, що усічені з обох кінців (тобто 1-14, 1-13, 1-12 і т. д. і 2-15, 3-15, 4-15 і т. д.), можна використовувати для ідентифікації мінімального епітопа.

Автори даного винаходу раніше визначили, що існує зв'язок між здатністю пептиду до зв'язування з молекулами МНС класу I або II і представлення Т-клітинам без додаткового процесингу і здатністю пептидів індукувати толерантність *in vivo* (WO 02/16410). Якщо пептид занадто довгий, щоб зв'язуватися з борозенкою пептидного зв'язування молекул МНС без додаткового процесингу (наприклад, тримінгу) або зв'язується в невідповідній конформації, тоді він не є толерогенним *in vivo*. Якщо, з іншого боку, пептид має придатний розмір і конформацію для безпосереднього зв'язування з борозенкою зв'язування МНС пептиду і представлення Т-



клітинам, тоді можна передбачати, що такий пептид може бути корисний для індукування толерантності.

Таким чином, можна досліджувати толерогенну здатність пептиду, досліджуючи можливість його зв'язування з молекулами МНС класу I або II і можливість його представлення Т-клітинам без додаткового процесингу антигену *in vitro*.

Пептиди даного винаходу являють собою апітопи (епітопи, незалежні від процесингу антигену) у тому, що вони здатні до зв'язування з молекулами МНС і здатні стимулювати реакції ТТГР-специфічних Т-клітин без додаткового процесингу антигену. Можна передбачати, що такі апітопи викликають толерантність до ТТГР, якщо додержуватися правил способу, розкритого в WO 02/16410.

Пептид даного винаходу може бути будь-якої довжини, якщо здатний до зв'язування з молекулою МНС класу I або II без додаткового процесингу. Звичайно пептид даного винаходу здатний до зв'язування з МНС класу II.

Пептиди, які зв'язуються з молекулами МНС класу I, звичайно бувають довжиною від 7 до 13, частіше від 8 до 10 амінокислот. Зв'язування пептиду стабілізується по двох його кінцях шляхом контактування між атомами основного ланцюга пептиду й інваріантними сайтами в пептидзв'язувальних борозенках усіх молекул МНС класу I. Існують інваріантні сайти з обох кінців борозенки, що зв'язують аміно- і карбоксикінці пептиду. Варіації довжини пептиду пристосовуються за рахунок згинання кістякового ланцюга пептиду, часто по пролінових або гліцинових залишках, що забезпечують гнучкість.

Пептиди, які зв'язуються з молекулами МНС класу II, звичайно бувають довжиною від 8 до 20 амінокислот, частіше від 10 до 17 амінокислот і можуть бути довше (наприклад, аж до 40 амінокислот). Такі пептиди розташовані у витягнутій конформації уздовж борозенок зв'язування пептидів МНС класу II, які (на відміну від борозенок зв'язування пептидів МНС класу I) відкриті з обох кінців. Пептиди зберігаються на місці головним чином за рахунок контактів атомів основного ланцюга з консервативними залишками, що вистилають борозенки зв'язування пептидів.

Пептиди даного винаходу можуть включати від 8 до 30 амінокислот, наприклад від 8 до 25 амінокислот, від 8 до 20 амінокислот, від 8 до 5 амінокислот або від 8 до 12 амінокислот.

#### ЧАСТИНА

Пептиди даного винаходу можуть включати всі або частину ТТГР-одержаних пептидів, представлених як послідовності SEQ ID NO: 1-3.

Термін "частина" стосується пептиду, який одержаний з SEQ ID NO: 1-3 і містить щонайменше мінімальний епітоп пептиду.

Такий пептид може включати одну або більше з мутацій, звичайно амінокислотних заміщень усередині ТТГР-одержаної послідовності. Така амінокислота може заміщати такі амінокислоти як гліцин, лізин або глутамова кислота. Пептид може включати аж до трьох, аж до двох або одне амінокислотне заміщення з ТТГР-одержаної послідовності.

Такий пептид може включати по одному або по обох кінцях амінокислоти, що не одержують із ТТГР послідовності. Наприклад, пептид може мати один або більше із залишків гліцину і/або лізину, і/або глутамової кислоти по одному або по обох кінцях. Наприклад, додаткові амінокислоти можуть включати гліциновий або лізиновий спейсер, після якого ідуть пари амінокислот KK, KE, EK або EE по одному або по обох кінцях.

Наприклад, такий пептид може мати наступну формулу:

KKG-ТТГР-одержана частина-GKK.

Пептид, що включає не-ТТГР-одержані амінокислоти, повинен бути апітопом, тобто повинен бути здатний до зв'язування з молекулою МНС *in vitro* і здатний бути представленим Т-клітині без процесингу антигену.

#### РЕЦЕПТОР ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНУ (ТТГР)

ХГ являє собою аутоімунне захворювання, викликане аутореактивними Т- і В-лімфоцитами, спрямованими в основному на аутоантиген, рецептор тиреотропного гормону (ТТГР).

ТТГР являє собою G-білок, зв'язаний з рецептором фолікулярних клітин щитовидної залози, що стимулює продукування тироксину (Т4) і трийодотироніну (Т3) за рахунок cAMP сигнального каскаду після зв'язування його ліганду, тиреоїдстимулюючого гормону (TSH). Після інтерналізації, розщеплення і презентації ТТГР за рахунок АПК, Т-клітини стають активованими і взаємодіють з аутореактивними В-клітинами, що у свою чергу викликає стимуляцію агоністичних аутоімунних антитіл, спрямованих проти ТТГР. Тиреоїдстимулюючі імуноглобуліни зв'язуються з тими ж самими рецепторними карманами, що і TSH, активуючи опосередкований ТТГР сигнал трансдукції і приводячи до продукування надлишку тиреоїдного гормону щитовидною залозою і до росту щитовидної залози.

ТТГР, також відомий як рецептор тиреотропіну, експресується, головним чином, на епітеліальних клітинах щитовидної залози.

ТТГР холорецептор містить 764 залишків і включає N-кінцевий позаклітинний домен, з яким зв'язуються TSH, серпентин (або трансмембранний домен) і C-кінцевий внутрішньоклітинний домен.

ТТГР включає великий позаклітинний домен (418 амінокислот) з висококонсервативними Сус-залишками, що полегшує утворення третинної структури позаклітинного домену, що може бути важливим як для зв'язування ліганду, так і для неактивної конформації рецептора. Такий позаклітинний домен включає більше половини довжини білка і є достатнім для зв'язування ліганду з високою афінністю. Після перенесення на поверхню клітини рецепторна молекула піддається внутрішньомолекулярному розщепленню, що приводить до видалення послідовності, яка містить 50 амінокислот, розташованої між залишками 316 і 366. В результаті зазначений рецептор включає дві субодиниці, причому субодиниця  $\alpha$  включає позаклітинний лігандзв'язувальний домен і субодиниця  $\beta$  включає трансмембранний домен і коротку C-кінцеву послідовність, зв'язані разом дисульфідними зв'язками. На наступних стадіях субодиницю  $\alpha$  видаляють, що приводить до надлишку лігандзв'язувального домену, позбавленого субодиниць  $\beta$ , на клітинній мембрані.

Після зв'язування циркулюючого TSH із ТТГР, сигнальний каскад G-білка активує аденілілциклазу, і внутрішньоклітинні рівні cAMP підвищуються. cAMP активує усі функціональні аспекти тиреоїдної клітини, включаючи накачування йоду, синтез тиреоглобуліну, йодування, ендцитоз і протеоліз, активність тиреоїдної пероксидази і виділення гормону.

Амінокислотна послідовність зрілого ТТГР представлена нижче (SEQ ID NO: 21).

```
1 mrapdlqlv lldlprdlg gmgcssppce chqeedfrvt ckdiqripls ppstqtkli
61 ethlritphs afsnlpnisr iyvsidvtlq qleshsfynl skvthieirn trnltyidpd
121 alkelpllkf lgifntglkm fpdltkvyst diffileitd npymtsipvn afqglcnetl
181 tlklynngft svqgyafngt kldavylkn kyltvidkda fggvysgpsl ldvsqtsvta
241 lpskglehik eliarntwtl kklplslsfl hltradlsyp shccafknqk kirgileslm
301 cnessmqslr qrksvnaIns plhqeyeenl gdsivgykek skfqdthnna hyyvffeeqe
361 deiigfgqel knpqeetlqa fdshydytic gdsedmvctp ksdefnpced imgykflriv
421 vwfvsllall gnvfvllll tshyklnvpr flmcnlafad fcmgmyllli asvdlythse
481 yynhaidwqt gpgcntagff tvfaselsvy tltvitlerw yaitfamrld rkirlrhaca
541 imvggwvccf llallplvgi ssyakvsicl pmdtetplal ayivfvltln ivafvivccc
601 yvkiyitvrn pqynpgdkdt kiakrmavli ftdficmapi sfyalsailn kplivtsnsk
661 illvlfypln scanpflyai ftkafqrdvf illskfgick rqaqayrgqr vppknstdiq
721 vqkvthdmrq ghlnmedvye lienshltpk kggqiseeym qtvI.
```

Пептид даного винаходу щонайменше частково одержують із ТТГР. Зазначений пептид або його частину можна одержати з ділянок 64-92, 78-106, 107-135, 136-164 або 201-229 ТТГР. Зазначений пептид або його частину можна одержати з фрагмента антигену, що утворюється в результаті природного процесингу антигену антигенпредставляючими клітинами.

Ділянка 64-92 ТТГР (RNB 4) має наступну послідовність:

LRTffSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL (SEQ ID NO: 2).

Пептид може включати мінімальний епітоп з наступного пептиду:

ТТГР 73-87 (RNB\_4J): SNLPNISRIYVSIDV (SEQ ID NO: 15),

ТТГР 73-87 (RNB\_4J-GKK): KKGSNLPNISRIYVSIDVGKK (SEQ ID NO: 16).

Пептид може включати мінімальний епітоп з наступного пептиду:

ТТГР 74-88 (RNB\_4K): NLPNISRIYVSIDVT (SEQ ID NO: 62),

ТТГР 74-88 (RNB\_4K-GKK): KKGSNLPNISRIYVSIDVTGKK (SEQ ID NO: 63).

Ділянка 78-106 ТТГР (RNB\_5) має наступну послідовність:

ISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHI (SEQ ID NO: 1).

Пептид може включати мінімальний епітоп з наступних пептидів: ТТГР 78-92 (RNB\_5A), 79-93 (RNB\_5B), 80-94 (RNB\_5C), 81-95 (RNB\_5D), 82-96 (RNB\_5E) і 83-97 (RNB\_5F).

Послідовності ТТГР 78-92, 79-93, 80-94, 81-95, 82-96 і 83-97 є наступними:

ТТГР 78-92 (RNB\_5A): ISRIYVSIDVTLQQL (SEQ ID NO: 6),

ТТГР 79-93 (RNB\_5B): SRIYVSIDVTLQQLE (SEQ ID NO: 7),

ТТГР 80-94 (RNB\_5C): RIYVSIDVTLQQLES (SEQ ID NO: 8),

ТТГР 81-95 (RNB\_5D): IYVSIDVTLQQLESH (SEQ ID NO: 9),

ТТГР 82-96 (RNB\_5E): YVSIDVTLQQLESHS (SEQ ID NO: 10),

ТТГР 83-97 (RNB\_5F): VSIDVTLQQLESHSF (SEQ ID NO: 11),

ТТГР 81-95 (RNB\_5D-GKK): KKGIIYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 12),

ТТГР 81-95 (RNB\_5D-KKK): KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 21),

TTGP 82-96 (RNB\_5E-GKK): KKGYSIDVTLQQLESHSGKK (SEQ ID NO: 13),

TTGP 83-97 (RNB\_5F-GKK): KKGVSIDVTLQQLESHSFGKK (SEQ ID NO: 14).

Пептид даного винаходу щонайменше частково одержують із TTGP. Зазначений пептид або його частину можна одержати з ділянок 64-92, 78-106, 107-135, 136-164 або 201-229 TTGP. Зазначений пептид або його частину можна одержати з фрагмента антигену, що утворюється в результаті природного процесингу антигену антигенпредставляючими клітинами.

Ділянка 64-92 TTGP (RNB 4) має наступну послідовність:

LRTffSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL (SEQ ID NO: 2).

Пептид може включати мінімальний епітоп з наступного пептиду:

TTGP 73-87 (RNB\_4J): SNLPNISRIYVSIDV (SEQ ID NO: 15),

TTGP 73-87 (RNB 4J-GKK): KKGSNLPNISRIYVSIDVGKK (SEQ ID NO: 16).

Пептид може включати мінімальний епітоп з наступного пептиду:

TTGP 74-88 (RNB\_4K): NLPNISRIYVSIDVT (SEQ ID NO: 62),

TTGP 74-88 (RNB\_4K-GKK): KKGNSLPNISRIYVSIDVTGKK (SEQ ID NO: 63).

Ділянка 78-106 TTGP (RNB\_5) має наступну послідовність:

ISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHI (SEQ ID NO: 1).

Пептид може включати мінімальний епітоп з наступних пептидів: TTGP 78-92 (RNB\_5A), 79-93 (RNB\_5B), 80-94 (RNB\_5C), 81-95 (RNB\_5D), 82-96 (RNB\_5E) і 83-97 (RNB\_5F).

Послідовності TTGP 78-92, 79-93, 80-94, 81-95, 82-96 і 83-97 є наступними:

TTGP 136-150 (RNB\_9A): TGLKMFPDLTKVYST (SEQ ID NO: 17),

TTGP 137-151 (RNB\_9B): GLKMFPDLTKVYST (SEQ ID NO: 18),

TTGP 138-152 (RNB\_9C): LKMFPDLTKVYSTDI (SEQ ID NO: 19),

TTGP 139-153 (RNB\_9D): KMFPDLTKVYSTDIF (SEQ ID NO: 20).

Ділянка 80-207 TTGP (RNB\_12) має наступну послідовність:

LTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYL (SEQ ID NO: 64).

Зазначений пептид може включати мінімальний епітоп з одного з пептидів, представлених у наступній таблиці.

			SEQ ID NO:
RNB-12	A	LTLKLYNNGFTSVQGG	65
	B	TLKLYNNGFTSVQGY	66
	C	LKLYNNGFTSVQGYA	68
	D	KLYNNGFTSVQGYAF	69
	E	LYNNGFTSVQGYAFN	70
	F	YNNNGFTSVQGYAFNG	71
	G	NNNGFTSVQGYAFNGT	72
	H	NGFTSVQGYAFNGTK	73
	I	GFTSVQGYAFNGTKL	74
	J	FTSVQGYAFNGTKLD	75
	K	TSVQGYAFNGTKLDA	76
	L	SVQGYAFNGTKLDAV	77
	M	VQGYAFNGTKLDAVY	78

Зазначений пептид може включати мінімальний епітоп з одного з наступних пептидів:

TTGP 180-194 (RNB\_12A): LTLKLYNNGFTSVQGG (SEQ ID NO: 65),

TTGP 180-194 (RNB\_12B): TLKLYNNGFTSVQGY (SEQ ID NO: 66),

TTGP 180-194 (RNB\_12B-KKK): KKKTLKLYNNGFTSVQGYKKK (SEQ ID NO: 67).

У даному винаході також запропонований пептид, що включає послідовність:

KK-(G/K)-aal-(RNB-5D-пептид)-aa2-aa3-Z-(G/K)-KK,

де aal не є амінокислотою, I, K або T;

RNB-5D-пептид являє собою YVSIDVTLQQLE, або його варіант, у якому одна або більше з амінокислот була замінена на K,

aa2 не є амінокислотою, S або K;

aa3 не є амінокислотою, H або K,

який здатний до зв'язування з молекулою MHC in vitro і здатний бути представлений T-клітині без процесингу антигену.

У розглянутому варіанті, RNB-5D-пептид може бути YVSIDVTLQQLE, або його варіантом, де одна, дві або три амінокислоти замінені на K.

Зазначений пептид можна вибрати з наступної групи, у якій усі члени ідентифіковані як апітопи (Таблиця 1):

KKGIYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 12), KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 22), KKGIVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 23), KKGIVKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 24), KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 25), KKGIVVSIDVTLQKLESHGKK (SEQ ID NO: 26), KKGIVVSIDVTLQQKLESHGKK (SEQ ID NO: 27), KKGIVVSIDVTLQQKLESHGKK (SEQ ID NO: 28), KKGIVVSIDVTLQQLEKHGKK (SEQ ID NO: 29), KKGIVVSIDVTLQQLESKGKK (SEQ ID NO: 30), KKGIVVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 31), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 32), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 33), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 34), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 35), KKGIVVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 36), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 37), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 38), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 39), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 40), KKGIVVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 41), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 42), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 43), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 44), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45), KKGIVVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 21), KKGIVVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46), KKGIVVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 47), KKGIVKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48), KKGIVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 49), KKGIVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 50), KKGIVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 51), KKGIVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 52), KKGIVSIDVTLQQKLESHKKK (SEQ ID NO: 53), KKGIVSIDVTLQQKLESHKKK (SEQ ID NO: 54), KKGIVSIDVTLQQLEKHKKK (SEQ ID NO: 55), KKGIVSIDVTLQQLESKKKK (SEQ ID NO: 56), KKGIVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57), KKGIVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 58), KKGIVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 59), KKGIVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60), KKGIVSIDVTLQKKEKKK (SEQ ID NO: 61).

Зазначений пептид можна вибрати з наступної групи, у якій усі члени ідентифіковані як апітопи і мають підвищену розчинність:

KKGIVVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 22), KKGIVKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 24), KKGIVVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 31), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 32), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 33), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 34), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 35), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 40), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 42), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45), KKGIVVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 46), KKGIVKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48), KKGIVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 49), KKGIVVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 57), KKGIVVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 58), KKGIVVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60), KKGIVVSIDVTLQKKEKKK (SEQ ID NO: 61).

Зазначений пептид можна вибрати з наступної групи, у якій усі члени ідентифіковані як апітопи і мають найбільш високу розчинність:

KKGIVKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 24), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 32), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 33), KKGIVVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 34), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 35), KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 42), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45), KKGIVVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 46), KKGIVKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48), KKGIVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 49), KKGIVVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 57), KKGIVVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 58), KKGIVVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60), KKGIVVSIDVTLQKKEKKK (SEQ ID NO: 61).

Наступні пептиди становлять найбільший інтерес:

KKGIVVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 32), KKGIVVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID NO: 34), KKGIVVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 46), KKGIVKSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 48), KKGIVVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 57), KKGIVVSIDVTLQKKEKKK (SEQ ID NO: 60).

#### ТОЛЕРАНТНІСТЬ

Т-клітинні епітопи відіграють центральну роль в адаптивних імунних реакціях на будь-який антиген, незалежно від того, свій він або чужий. Центральна роль, яку грають Т-клітинні епітопи в захворюваннях, пов'язаних з гіперчутливістю (які включають алергію, аутоімунні захворювання і відторгнення трансплантатів), була продемонстрована з використанням експериментальних моделей. Існує можливість викликати запальні або алергічні захворювання шляхом ін'єкцій синтетичних пептидів (основаних на структурі Т-клітинних епітопів) у комбінації з ад'ювантом.

Навпаки, була продемонстрована можливість індукції імунотолерантності відносно конкретних антигенів шляхом введення пептидних епітопів у розчинній формі. Було продемонстроване введення розчинних пептидних антигенів як ефективних засобів інгібування захворювань при експериментальному аутоімунному енцефаломієліті (EAE - модель розсіяного склерозу (MS)) (Metzler and Wraith (1993), Int. Immunol. 5:1159-1165; Liu and Wraith (1995), Int. Immunol. 7:1255-1263; Anderton and Wraith (1998), Eur. J. Immunol. 28:1251-1261); і в експериментальних моделях артриту, діабету й увеоретиніту (огляд Anderton and Wraith (1998), див. вище). Введення пептидних антигенів було також продемонстроване як засіб лікування при перебігу захворювання у EAE (Anderton and Wraith (1998), див. вище).

Толерантність являє собою нездатність до реакції на антиген. Толерантність до "своїх" антигенів є суттєвою особливістю імунної системи і, якщо вона втрачена, може виникнути аутоімунне захворювання. Адаптивна імунна система повинна зберігати здатність реагувати на величезну різноманітність інфекційних агентів і при цьому уникати аутоімунних атак своїх антигенів, що містяться у власних тканинах. Значною мірою це контролюється чутливістю незрілих Т-лімфоцитів до апоптотичної загибелі клітин у тимусі (центральна толерантність). Однак не усі свої антигени визначаються в тимусі, і тому загибель аутореактивних тимоцитів залишається неповною. Існують також механізми, відповідно до яких толерантність може бути набута за рахунок зрілих аутореактивних Т-лімфоцитів у периферичних тканинах (периферична толерантність). Огляд механізмів центральної і периферичної толерантності наведений у Anderton et al. (1999) (*Immunological Reviews*, 169:123-137).

На даний час вважають, що ХГ викликається ТТГР-стимулюючими аутоімунними антитілами, що зв'язуються з ТТГР і активують їх, тим самим стимулюючи синтез і секрецію тиреоїдного гормону і ріст щитовидної залози.

Пептиди даного винаходу здатні індукувати толерантність до ТТГР, так що, будучи введені суб'єкту, вони можуть відновити толерантність до ТТГР свого білка і ослабити патогенну імунну реакцію.

Толерантність може виникнути в результаті або може характеризуватися індукуванням енергії в щонайменше частині CD4+Т-клітин. Щоб активувати Т-клітини, пептид повинен асоціюватися з "професійними" АПК, здатними передавати два сигнали до Т-клітин. Перший сигнал (сигнал 1) передається комплексом МНС-пептид на поверхні клітин АПК і сприймається Т-клітинами за допомогою TCR. Другий сигнал (сигнал 2) передається костимуляторними молекулами на клітинній поверхні АПК, такими як CD80 і CD86, і сприймається CD28 на поверхні Т-клітин. Вважають, що, якщо Т-клітини одержують сигнал за відсутності сигналу 2, вони не активуються й, у дійсності, стають анергічними. Анергічні Т-клітини несприйнятливі до наступної стимуляції антигеном і можуть бути здатні пригнічувати інші імунні реакції. Вважають, що анергічні Т-клітини залучені в опосередковану Т-клітинами толерантність.

Пептиди, які вимагають процесингу до того, як вони можуть бути представлені в сукупності з молекулами МНС, не індукують толерантність, оскільки вони повинні бути оброблені зрілими антигенпредставляючими клітинами. Зрілі антигенпредставляючі клітини (такі як макрофаги, В-клітини і дендритні клітини) здатні до процесингу антигену, але також і до передачі обох сигналів 1 і 2 до Т-клітин, що викликає активацію Т-клітин. Апітопи, з іншого боку, будуть здатні зв'язувати МНС класу II з незрілими АПК. Таким чином, вони будуть представлені Т-клітинам без костимуляції, що приведе до анергічності Т-клітин і до толерантності.

Природно, апітопи також здатні зв'язуватися з молекулами МНС на клітинній поверхні зрілих АПК. Однак імунна система містить набагато більшу кількість незрілих АПК, ніж зрілих АПК (передбачалося, що активується менше ніж 10 % дендритних клітин, Summers et al. (2001), *Am. J. Pathol.* 159:285-295). Неправильне положення відносно апітопа скоріше приведе до анергії/толерантності, ніж до активації.

Було показано, що, якщо толерантність індукують за допомогою інгаляції пептидами, здатність антигенспецифічних CD4+ Т-клітин до проліферації знижується. Також, продукування IL-2, IFN- $\gamma$  і IL-4 такими клітинами знижується, але продукування IL-10 підвищується.

Було показано, що нейтралізація IL-10 у мишей у стані пептидіндукованої толерантності повністю відновлює сприйнятливості до захворювання. Було висловлене припущення, що в толерантному стані зберігається популяція регуляторних клітин, що продукують IL-10 і опосередковують імунну регуляцію (Burkhart et al. (1999), *Int. Immunol.* 11:1625-1634).

#### КОМПОЗИЦІЇ

Даний винахід також стосується композицій, таких як фармацевтичні композиції, які включають один або більше з пептидів відповідно до першого або другого аспектів даного винаходу. Такий пептид може включати множину пептидів, наприклад два, три, чотири, п'ять або шість пептидів. Композиції даного винаходу можуть бути призначені для профілактичного або терапевтичного використання. Якщо композицію вводять із профілактичною метою, така композиція може знижувати або запобігати виробленню імунної реакції на ТТГР. Рівень імунної реакції виявляється менше, ніж рівень у випадку, якби пацієнту не була введена композиція. Термін "знижує" означає, що спостерігається часткове зниження імунної реакції, наприклад, таке як зниження реакції на 50 %, 70 %, 80 % або 90 %, у порівнянні з тим, що спостерігалось б, якби пацієнту не ввели композицію (або спостерігалось б у не підданого обробці пацієнта за той же самий проміжок часу). Термін "запобігає" означає, що не спостерігається суттєвої імунної реакції на ТТГР.

Якщо композицію вводять для терапевтичного використання, композиція може пригнічувати вже існуючу імунну реакцію на ТТГР. Термін "пригнічує" указує на зниження рівня існуючої імунної реакції, у порівнянні з рівнем, що спостерігався до введення пептиду, або з рівнями, що спостерігалися б у той же момент часу, якби не був уведений пептид.

Введення композиції даного винаходу може стати причиною зниження рівня будь-якого або усіх з наступних:

- i) ТТГР аутоімунних антитіл,
- ii) CD4+Т-клітин, специфічних для ТТГР,
- iii) В-клітин, секретуючих ТТГР аутоімунні антитіла.

Визначення усіх факторів можна здійснити, використовуючи способи, добре відомі фахівцям у даній галузі, такі як ELISA, цитометрія в потоці і т. д.

Лікування композиціями даного винаходу може також або альтернативно стати причиною анергії в CD4+Т-клітинах, специфічних для ТТГР. Анергію можна визначити, наприклад, здійснюючи наступну імунізацію ТТГР in vitro.

У випадку, якщо існують два або більше апітопів, фармацевтична композиція може бути у формі набору, у якому кожний або декілька з апітопів представлені окремо для одночасного, роздільного або послідовного введення.

Альтернативно (або на доповнення), якщо фармацевтична композиція (або будь-яка її частина) повинна бути введена у вигляді множини доз, кожна доза може бути упакована окремо.

Також, у фармацевтичних композиціях даного винаходу будь-який або кожен апітоп може бути в суміші з будь-яким придатним зв'язуючим(и), суспендуєчим агентом (агентами), покривним агентом (агентами) або солюбілізуєчим агентом (агентами).

#### ЛІКАРСЬКІ ФОРМИ

Композиції даного винаходу можна приготувати у вигляді композицій для ін'єкцій або у вигляді рідких розчинів або суспензій; можна також приготувати у вигляді твердих форм, придатних для розчинення або суспендування в рідині перед ін'єкцією.

Лікарські форми можуть також бути емульговані або пептиди можуть бути інкапсульовані в ліпосоми.

Активні інгредієнти можуть бути змішані з ексципієнтами, які є фармацевтично прийнятними і сумісними з активним інгредієнтом.

Придатними ексципієнтами є, наприклад, вода, сольовий розчин (наприклад, буферований фосфатом сольовий розчин), декстроза, гліцерин, етанол або т. п. і їх комбінації.

Крім того, при бажанні, композиції даного винаходу можуть містити невеликі кількості допоміжних речовин, таких як змочувальні або емульгуючі речовини і/або буферуючі рН речовини. Буферуючі солі, включаючи фосфати, цитрати, ацетати, хлористоводневу кислоту і/або гідроксид натрію, можуть бути використані для регулювання величини рН. Для стабілізації можуть бути використані дисахариди, такі як сахароза або трегалоза.

Якщо композиція включає множини пептидів, відносна кількість пептидів може бути приблизно рівною. Альтернативно, відносні кількості кожного з пептидів можуть змінюватися, наприклад, для того, щоб сфокусувати толерогенну реакцію на конкретному різновиді аутореактивних Т-клітин або у випадку, якщо виявлено, що один з пептидів функціонує краще інших у конкретних HLA-типах.

Після приготування композиції даного винаходу можна помістити в стерильні контейнери, які потім запаюють і зберігають при низьких температурах, наприклад при 4°C, або їх можна висушити заморожуванням.

Зручно приготувати композиції у вигляді ліофілізованого (висушеного заморожуванням) порошку. Ліофілізація забезпечує тривалий термін зберігання в стабілізованій формі. Процедури ліофілізації добре відомі фахівцям у даній галузі, див., наприклад, <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>.

Збільшуючі об'єм речовини використовують перед сушінням виморожуванням, такі як маніт, декстран або гліцин.

Композиції даного винаходу можна вводити звичайними способами, таким як пероральний, внутрішньовенний (якщо вони водорозчинні), внутрішньом'язовий, підшкірний, сублінгвальний, трансназальний, черезшкірний або у вигляді супозиторіїв або за допомогою імплантацій (наприклад, використовуючи повільно вивільнювані молекули).

Композиції даного винаходу вигідно вводити інтраназально, підшкірно або черезшкірно.

Пептиди і композиції даного винаходу можна використовувати для лікування людей. Такими пацієнтами можуть бути пацієнти з хворобою Грейвса. Пацієнти можуть мати ТТГР аутоімунні антитіла.

Такі суб'єкти можуть мати HLA-гаплотип, що пов'язаний зі схильністю до вироблення інгібіторних ТТГР аутоімунних антитіл. Суб'єкт може експресувати HLA-DR3 або HLA-DR4. Способи визначення HLA-гаплотипу у індивідуумів добре відомі фахівцям у даній галузі.

Звичайно лікар визначає реальні дози, що будуть найбільш придатними для індивідуального пацієнта, і такі дози будуть варіюватися залежно від віку, маси і реакції конкретного пацієнта.

У переважному варіанті може бути використана схема "збільшення доз", при якій пацієнту вводять множину доз у зростаючих концентраціях. Такий підхід використовують, наприклад, для пептидів фосфоліпази А2 у імунотерапевтичних застосуваннях проти алергії на бджолину отруту (Miiller et al. (1998), J. Allergy Clin. Immunol. 10:747-754, і Akdis et al. (1998), J. Clin. Invest. 102:98-106).

#### НАБОРИ

Звичайно, якщо композиція включає множину пептидів, їх можна вводити спільно у формі змішаної композиції або коктейлю. Однак можуть виникнути обставини, при яких переважно надавати пептиди окремо у формі набору для одночасного, роздільного, послідовного або комбінованого введення.

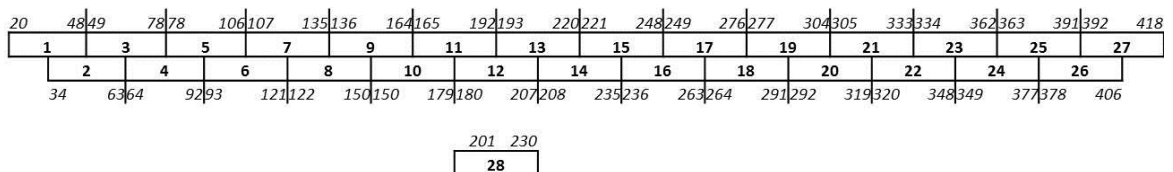
Такі набори можуть також включати засоби змішування і/або введення (наприклад, випарник для інтраназального введення або шприци і голки для підшкірного/черезшкірного введення доз). Такі набори можуть також включати інструкції для застосування.

Фармацевтичні композиції або набори даного винаходу можна використовувати для лікування і/або профілактики захворювань. Зокрема, композиції/набори даного винаходу можна використовувати для лікування і/або профілактики хвороби Грейвса.

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Селекція HLA-DR3 ТТГР-пептидів

Для визначення важливих ділянок у ТТГР, ECD ТТГР (AA20-418) розділяють на 28 пептидів, що перекриваються, які містять 28-30 амінокислот (28-30-мер), що перекриваються 15 амінокислотами, як зображено нижче.



Назва	Довжина (AA)	Послідовність
RNB-1	29	GGMGCSSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIP
RNB-2	30	EEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETH
RNB-3	30	SLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNI
RNB-4	29	LRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL
RNB-5	29	ISRIYVSIDVTLQQLSHSFYNLSKVTHI
RNB-6	29	ESHSFYNSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDA
RNB-7	29	EIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFN
RNB-8	29	LKELPLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYST
RNB-9	29	TGLKMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM
RNB-10	30	TDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNET
RNB-11	28	TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSV
RNB-12	28	LTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYL
RNB-13	28	QGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDA
RNB-14	28	NKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQ
RNB-15	28	FGGVYSGPSLLDVSQTSVTALPSKGLEH
RNB-16	28	TSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKL
RNB-17	28	LKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRAD
RNB-18	28	PLSLSFLHLTRADLSYP SHCCAFKNQKK
RNB-19	28	LSYP SHCCAFKNQKKIRGILESLMCNES
RNB-20	28	IRGILESLMCNESSMQSLRQRKSVNALN
RNB-21	29	SMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDS
RNB-22	29	SPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHN
RNB-23	29	IVGYKEKSKFQDTHNNAHYVFFEEQEDE

Назва	Довжина (AA)	Послідовність
RNB-24	29	NAHYVVFEEQEDEIIGFGQELKNPQEET
RNB-25	29	IIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTCG
RNB-26	29	LQAFDSHYDYTCGDSMEDMVCTPKSDEFN
RNB-27	27	DSEDMVCTPKSDEFNPCEDIMGYKFLR
RNB-28	29	KLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPS

Потім оцінюють імуногенність усіх пептидів шляхом імунізації ULA-DRB1\*0301 трансгенних мишей (DR3-миші) 200 мкг пулу з 3 пептидів, емульгованих у CFA. Через 10 днів виділяють LN-клітини і спленоцити і стимулюють *in vitro*, використовуючи 10-25 мкг/мл відповідних індивідуальних пептидів. Було виявлено, у розрахунку на індекси стимуляції (IC; включення 3H-тимідину (імпульси на хвилину) стимульованих пептидом клітин ділене на значення для нестимульованих клітин), що пептиди RNB-5 і RNB-9 мають високу імуногенність (IC>10).

Фіг. 1 демонструє, що LN (лімфатичні вузли) і спленоцити, виділені з RNB-5-імунізованих мишей, сильно реагують на RNB-5-стимуляцію *in vitro*.

Усі розкриті далі приклади будуть сфокусовані на пептидах RNB-5.

Приклад 2. Ідентифікація епітопів усередині RNB-5

Для визначення точного положення епітопів усередині RNB-5, синтезують панель 15-мерних пептидів, що перекриваються, які охоплюють RNB-5, використовуючи стандартну F-мос-хімію. Кожен пептид замінюють 1 амінокислотою, як представлено далі.

Назва	Послідовність
RNB_5A	ISRIYVSIDVTLQQL
RNB_5B	SRIYVSIDVTLQQLE
RNB_5C	RIYVSIDVTLQQLES
RNB_5D	IYVSIDVTLQQLESH
RNB_5E	YVSIDVTLQQLESHS
RNB_5F	VSIDVTLQQLESHSF
RNB_5G	SIDVTLQQLESHSFY
RNB_5H	IDVTLQQLESHSFYN
RNB_5I	DVTLQQLESHSFYNL
RNB_5J	VTLQQLESHSFYNLS
RNB_5K	TLQQLESHSFYNLSK
RNB_5L	LQQLESHSFYNLSKV
RNB_5M	QQLESHSFYNLSKVT
RNB_5N	QLESHSFYNLSKVTH
RNB_5O	LESHSFYNLSKVTHI

Назва	Модифікована послідовність
RNB_5D-GKK =RNB_5D_G0	KKGIYVSIDVTLQQLESHGKK
RNB_5E-GKK	KKGYVSIDVTLQQLESHSGKK
RNB_5F-GKK	KKGVSIDVTLQQLESHSFGKK
RNB_5D_KKK =RNB_5D_K0	KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_G1	KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G2	KKGIKVSIDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G3	KKGIYKSIDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G4	KKGIYVKIDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G5	KKGIYVSKDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G6	KKGIYVSIKVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G7	KKGIYVSIDKTLQQLESHGKK
RNB_5D_G8	KKGIYVSIDVKLQQLESHGKK
RNB_5D_G9	KKGIYVSIDVTKQQLESHGKK
RNB_5D_G10	KKGIYVSIDVTLKQLESHGKK
RNB_5D_G11	KKGIYVSIDVTLQKLESHGKK
RNB_5D_G12	KKGIYVSIDVTLQKQLESHGKK
RNB_5D_G13	KKGIYVSIDVTLQQLKSHGKK



Назва	Модифікована послідовність
RNB_5D_G14	KKGIYVSIDVTLQQLEKHGKK
RNB_5D_G15	KKGIYVSIDVTLQQLESKGKK
RNB_5D_G16	KKGYVSIDVTLQQLEGKK
RNB_5D_G17	KKGYVSIDVKLQQLEGKK
RNB_5D_G18	KKGYVSIDVTLQKLEGKK
RNB_5D_G19	KKGYVSIDVTLQQKEGKK
RNB_5D_G20	KKGYVSIDVKLQKKEGKK
RNB_5D_G21	KKGIYVSIDVTLQQLEGKK
RNB_5D_G22	KKGIYVSIDVKLQQLEGKK
RNB_5D_G23	KKGIYVSIDVTLQKLEGKK
RNB_5D_G24	KKGIYVSIDVTLQQKEGKK
RNB_5D_G25	KKGIYVSIDVKLQKKEGKK
RNB_5D_G26	KKGTYYSIDVTLQQLEGKK
RNB_5D_G27	KKGTYYSIDVKLQQLEGKK
RNB_5D_G28	KKGTYYSIDVTLQKLEGKK
RNB_5D_G29	KKGTYYSIDVTLQQKEGKK
RNB_5D_G30	KKGTYYSIDVKLQKKEGKK
RNB_5D_K1	KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K2	KKKIKVSIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K3	KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K4	KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K5	KKKIYVSKDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K6	KKKIYVSIKVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K7	KKKIYVSIDKTLQQLESHKKK
RNB_5D_K8	KKKIYVSIDVKLQQLESHKKK
RNB_5D_K9	KKKIYVSIDVTKQQLESHKKK
RNB_5D_K10	KKKIYVSIDVTLKQLESHKKK
RNB_5D_K11	KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK
RNB_5D_K12	KKKIYVSIDVTLQQKESHKKK
RNB_5D_K13	KKKIYVSIDVTLQQLKSHKKK
RNB_5D_K14	KKKIYVSIDVTLQQLEKHKKK
RNB_5D_K15	KKKIYVSIDVTLQQLESKKKK
RNB_5D_K16	KKKYVSIDVTLQQLEKKK
RNB_5D_K17	KKKYVSIDVKLQQLEKKK
RNB_5D_K18	KKKYVSIDVTLQKLEKKK
RNB_5D_K19	KKKYVSIDVTLQQKEKKK
RNB_5D_K20	KKKYVSIDVKLQKKEKKK

Спочатку пептиди аналізують, використовуючи гібридами, створені на основі DR3-мишей. Показано, що гібридами, специфічні для ТТГР і RNB-5, реагують з RNB-5A-F, представленими як свіжими, так і фіксованими VAVY-клітинами. Антигеніндуковане продукування IL-2 представницькими клонами зображено на Фіг. 2.

Для визначення здатності зазначених 15-мерних пептидів зв'язуватися з HLA-DR молекулами, використовують 2 програми: NetMHCII (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>) і базу даних імунних епітопів (Immune Epitope DataBase) ([http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc\\_II\\_binding.html](http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html)). Використовуючи обидва методи, вкладені пептиди RNB-5A аж до RNB-5F ідентифікують як такі, що ефективно зв'язуються як з HLA-DRB1\*0301, так і з HLA-DRB1\*0401 молекулами.

Хоча ХГ у людей значною мірою пов'язана з HLA-DRB1\*0301 гаплотипом, HLA-DRB1\*0401 гаплотип також часто зустрічається у пацієнтів із ХГ. Оскільки передбачено, що RNB-5A до 5F пептиди зв'язуються з HLA-DRB1\*0401 молекулами, RNB-5 тестують відносно їх здатності викликати імунну реакцію у DR4-мишей *in vivo*. LN-клітини і спленоцити, виділені з RNB-5/CFA-імунізованих DR4-мишей, демонструють сильні імунні реакції при стимуляції RNB-5 вкладеними пептидами. Крім того, RNB-5-специфічні гібридами, створені в DR3-мишах, реагують на RNB-5 вкладені пептиди, будучи представленими BM14-клітинами (HLA-DRB1\*0401). Тому, нові гібридами створюють шляхом імунізації DR4-мишей ТТГР/CFA. Гібридами, специфічні як для ТТГР-білка, так і для RNB-5-пептиду, відбирають для ідентифікації апітопів усередині RNB-5. Пептиди RNB-5A до 5F знову ідентифікують як апітопи (Фіг. 3). RNB-5DEF вкладені пептиди

модифікують, додаючи амінокислоти 'GKK' з обох С- і N-кінців. ТТГР- і RNB-5-специфічні гібридами також реагують із зазначеними модифікованими пептидами, будучи представленими як свіжими, так і фіксованими АПК. Узяті разом, одержані результати підкреслюють те, що зазначена ділянка представляє інтерес для ХГ-пацієнтів HLA-DRB1\*0301 або HLA-DRB1\*0401 гаплотипів.

Було показано, що частина ТТГР-специфічних гібридом, створених шляхом імунізації DR4-мишей за допомогою ТТГР/CFA, зв'язуються з RNB-4 замість RNB-5, що вказує на присутність інших імуногенних ділянок усередині ТТГР. RNB-4-специфічні гібридами вибирають для ідентифікації апітопів усередині RNB-4. Пептид RNB-4J ідентифікують як апітоп (Фіг. 4). RNB-4 вкладені пептидні послідовності представлені в таблиці далі.

Назва	Послідовність
RNB_4A	LRTIPSHAFSNLPNI
RNB_4B	RTIPSHAFSNLPNIS
RNB_4C	TIPSHAFSNLPNISR
RNB_4D	IPSHAFSNLPNISRI
RNB_4E	PSHAFSNLPNISRIY
RNB_4F	SHAFSNLPNISRIYV
RNB_4G	HAFSNLPNISRIYVS
RNB_4H	AFSNLPNISRIYVSI
RNB_4I	FSNLPNISRIYVSID
RNB_4J	SNLPNISRIYVSIDV
RNB_4K	NLPNISRIYVSIDVT
RNB_4L	LPNISRIYVSIDVTL
RNB_4M	PNISRIYVSIDVTLQ
RNB_4N	NISRIYVSIDVTLQQ

Назва	Модифікована послідовність
RNB_4J-GKK	KKGSNLPNISRIYVSIDVGKK
RNB_4K-GKK	KKGNLPNISRIYVSIDVTGKK

Досліджують також апітопний статус RNB-5D-модифікованих пептидів (Фіг. 20).

На доповненні до RNB-4 і RNB-5-апітопів, комп'ютерне програмне моделювання також показало, що пептиди RNB-9A до 9D є сильними зв'язуючими з HLA-DRB1\*0301 молекулами. Їх пептидні послідовності представлені далі в таблиці.

Назва	Послідовність
RNB_9A	TGLKMFPDLTKVYST
RNB_9B	GLKMFPDLTKVYSTD
RNB_9C	LKMFPDLTKVYSTDI
RNB_9D	KMFPDLTKVYSTDIF

Тестують реакції ТТГР- і RNB-5-специфічних гібридомних клонів, виділених з HLA-DR3- або HLA-DR4-мишей, імунізованих ТТГР/CFA, з RNB-5D-модифікованими пептидами. Результати представлені на Фіг. 11 до 15.

Приклад 3. Аналіз толерантності ex vivo

Для оцінки здатності RNB-5-апітопів індукувати толерантність, спочатку досліджують здатність зазначених апітопів інгібувати реакції у здорових HLA-DRB1\*0301 або HLA-DRB1\*0401 ex vivo. Мишей попередньо обробляють різними RNB-5 апітопами згідно зі схемами високих доз або зростаючих доз, що розкрито в розділі спосіб. Дослідження показали, що попередня обробка RNB-5 апітопами значно знижує ТТГР-індуковану Т-клітинну проліферацію, як у DR3-, так і у DR4-мишей (Фіг. 6A-D). RNB-5DEF вкладені пептиди модифікують, додаючи амінокислоти 'GKK' з обох С- і N-кінців. Обробка такими модифікованими апітопами до лікування також значно знижує ТТГР-індуковану Т-клітинну проліферацію (Фіг. 6E-F).

Було передбачено, що пептиди RNB-9A до 9D ефективно зв'язуються з HLA-DRB1\*0301 молекулами, і їх здатність індукувати специфічну імунну толерантність також досліджували. DR3-мишей попередньо обробляють RNB-9A до 9D згідно зі схемою збільшення доз. Попередня обробка RNB-9B і 9C викликає значне зниження ТТГР-індукованої Т-клітинної проліферації як в LN, так і в клітинах спленоцитів (Фіг. 7).

Було також показано, що пептид RNB4K-GKK значно знижує ТТГР-індуковану Т-клітинну проліферацію у DR4-мишей (Фіг. 16). RNB-5D-модифіковані пептиди також значно знижують ТТГР-індуковану Т-клітинну проліферацію.

Представницькі приклади експериментів з RNB5D-K1, RNB5D-K3 і RNB5D-K16 представлені на Фіг. 19.

Приклад 4. Експериментальна модель ХГ на тваринах

Для дослідження здатності RNB-5-апітопів зменшувати ХГ-подібні симптоми у мишей, були розроблені дві різні моделі ХГ на тваринах.

Спочатку C57/B16-мишей імунізують ТТГР/СФА для індукування вироблення анти-ТТГР антитіл. Для дослідження того, чи приведе бустерна імунізація до подальшого підвищення рівня анти-ТТГР антитіл, для однієї групи мишей проводять другу імунізацію ТТГР/ІФА через 4 тижні. Рівні анти-ТТГР антитіл у сироватці мишей, імунізованих один раз, досягають рівня плато через 2 тижні після імунізації. Вторинна імунізація викликає суттєве підвищення рівнів анти-ТТГР антитіл (Фіг. 8).

По-друге, Balb/c-мишам вводять ін'єкцією LacZ-Ad або ТТГР-Ad вірусні частинки для індукування гіпертиреоїдизму, викликаного дією анти-ТТГР антитіл на щитовидну залозу. Рівні Т4-гормону і повний титр анти-ТТГР антитіл IgG у сироватці всіх мишей вимірюють до, через 4 тижні після і через 10 тижнів після першої ін'єкції аденовірусних векторів (Фіг. 9). Імунізація мишей  $10^{10}$  ТТГР-Ad вірусними частинками викликає гіпертиреоїдизм у 3/7 мишей і 1/7 мишей при вимірюваннях через 4 тижні і через 10 тижнів після першої імунізації, відповідно. Результати показали, що рівні Т4 у 2 мишей нормалізувалися протягом експерименту. Імунізація мишей  $10^{11}$  ТТГР-Ad вірусними частинками індукувала гіпертиреоїдизм у 1/6 мишей, як через 4 тижні, так і через 10 тижнів після першої імунізації. Отже, одна миша з гіпертиреоїдизмом через 4 тижні мала нормальні рівні Т4 через 10 тижнів, тоді як рівні Т4 у інших мишей сильно підвищилися між 4 і 10 тижнями. Рівні анти-ТТГР антитіл вимірюють як повні значення IgG, не визначаючи їх стимулюючий або блокуючий ефект відносно ТТГР (Фіг. 10). Імунізація мишей ТТГР-Ad вірусними частинками чітко індукує продукування анти-ТТГР антитіл. Миші, імунізовані  $10^{10}$  або  $10^{11}$  ТТГР-Ad вірусними частинками, продукують значно більше антитіл, ніж LacZ-Ad імунізовані миші. Рівні анти-ТТГР антитіл не відрізняються для  $10^{10}$ -ТТГР-Ad і  $10^{11}$ -ТТГР-Ad імунізованих мишей. Не виявлено кореляції між повними рівнями IgG анти-ТТГР антитіл і рівнями Т4.

Описані моделі на тваринах використовують для дослідження того, чи можуть RNB-5-апітопи зменшувати симптоми, подібні до симптомів ХГ in vivo.

Приклад 5. Ідентифікація апітопів у ділянці RNB12

RNB12 також як вкладені пептиди не є імуногенними у мишей. Тому зазначену ділянку ідентифікують по реакційній здатності Т-клітинної лінії, одержаної від пацієнтів із хворобою Грейвса. На Фіг. 17 представлені результати, одержані для такої Т-клітинної лінії.

Підтверджено, що RNB12 і модифікований пептид RNB12-K є апітопами (Фіг. 18).

Матеріали і методи

40 Миші

HLA-DRB1\*0301 трансгенних мишей (DR3-миші) вирощують і утримують у імуногенетичній мишачій колонії Mayo Clinic. HLA DR3-tg мишей-засновників одержують від Gunter Hammerling (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany). Коротко, 6-kb NdeI фрагмент HLA DRA геномного клону в pUC і 24-kb ClaI/SalI фрагмент cos 4.1, що містить В-ген, спільно вводять у запліднені яйця (C57BL/6×DBA/2)-F1 донорів, спарених з C57BL/6-самцями. Трансгенних мишей схрещують з I-Ab нокаутними мишами. DR3-мишей схрещують з C57BL/10 фоновим генотипом протягом 10 поколінь. Такі DR3-миші експресують молекули HLA-DRB1\*0301, але не мишачі молекули МНС-II.

Зазначений штам DR4-мишей початково створюють за способом Lars Fugger et al. (PNAS 1994; volume 91:6151-6155) у тому, що HLA-DRA\*0101/HLA-DRB1\*0101 і mCD3-huCD4c/g конструкції спільно мікроін'єктують в ембріони від (DBA/1(A.CA)F1 схрещування, і життєздатні ембріони переносять у псевдовагітних самок (Balb/c(129)F1 для розвитку до терміну. Одержане потомство пізніше схрещують з I-Ab нокаутним C57BL/6 фоновим генотипом (AB0 миші), у яких відсутня експресія мишачих молекул МНС класу II. Тому тільки молекули МНС класу II, експресовані такими DR4-мишами, є людськими HLA DR4 молекулами.

Дослідження на тваринах були дозволені 'Етичним комітетом для експериментів на тваринах' (ECD) в університеті Hasselt University і здійснювалися відповідно до вищих стандартів догляду у віварії, що не містить патогенів.

Пептиди

Пептиди синтезовані в GL Biochem Ltd. (Shanghai, China) і зберігаються в диметилсульфоксиді (ДМСО; Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) при -80°C.

Дослідження зв'язування пептидів з HLA-DRB1\*0301

Сервер NetMHCII 2.2

5 Сервер NetMHCII 2.2 прогнозує зв'язування пептидів з HLA-DRB1\*0301 з використанням штучних нейронних мереж. Передбачувані значення виражені в нМ IK50-значень. Пептиди, що мають сильну і слабку зв'язувальну здатність, зазначені у висновках. Пептиди, що мають високу зв'язувальну здатність, мають значення IK50 нижче, ніж 50 нМ, і пептиди, що мають низьку зв'язувальну здатність, мають значення IK50 нижче 500 нМ. Результати представлені як  
10 передбачувана оцінка, розрахована наступним чином:  $1 - \log_{50000}(\text{aff})$ . Адреса веб-сайту: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>.

База даних імунних епітопів (IEDB): метод консенсусу

Для кожного пептиду, перцентильний ранг для кожного з чотирьох методів (ARB, комбінаторна бібліотека, підгонка і Sturniolo) створюють, порівнюючи оцінки пептидів з оцінками  
15 для п'яти мільйонів випадкових 15-мерів, вибраних з бази даних SWISSPROT. Нечисленний перцентильний ранг свідчить про високу спорідненість. Середній перцентильний ранг із чотирьох способів потім використовують для створення узгодженого способу. Адреса веб-сайту: [http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc\\_II\\_binding.html](http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html).

Визначення імуногенності довгих пептидів

20 Примування

DR3-мишам підшкірно вводять у основу хвоста 100 мкг антигену в PBS (Lonza, Verviers, Belgium), емульгованого в повному ад'юванті Фрейнда ((CFA; BD Benelux, Erembodegem, Belgium), що містить 4 мг/мл Mycobacterium tuberculosis (MTb, BD Benelux)) (100 мкл/ін'єкцію). Залежно від експерименту RNB-пептиди або повної довжини ТТГР-289-білок використовують як  
25 антиген. Контрольним тваринам в той же самий час вводять тільки PBS/CFA.

Клітинна культура

Через десять днів після імунізації, дренажні лімфатичні вузли (LN) і селезінку витягають. LN-клітини і спленоцити виділяють і культивують у X-vivo 15 середовищі (доповненому глутаміном, пеніциліном і стрептоміцином; Lonza) у 96-ямоквих плоскодонних планшетах. Для дослідження  
30 антигеніндукованої клітинної проліферації,  $0,5 \times 10^6$  клітин/ямку культивують (200 мкл/ямку) протягом 72 годин з різними концентраціями антигену (0-25 мкг/мл) або з 12,5 мкг/мл очищеного білкового похідного (PPD; контроль примування; Statens serum institut, Copenhagen, Denmark).

Аналіз проліферації й аналіз цитокінів

Через 72 години, 60 мкл клітинної надосадової рідини збирають і заморожують. Потім до  
35 клітин додають 20 мкл/ямку міченого тритієм тимідину (PerkinElmer, Zaventem, Belgium) до одержання кінцевої концентрації 1 мкКюрі/ямку. Клітини інкубують при 37°C, і через 16 годин планшети заморожують. Розморожені планшети збирають і зчитують, використовуючи β-лічильник (Wallac 1450 Microbeta Trilux Liquid Scintillation Counter) для оцінки клітинної проліферації. Розморожену надосадову рідину аналізують, використовуючи мишачі Th1/Th2  
40 10plex FlowCytomix Multiplex (Bender MedSystems, Vienna, Austria), для вимірювання антигеніндукованого продукування цитокінів.

Створення RNB-5-специфічних гібридом

Примування і створення Т-клітинної лінії

У день 0, мишам підшкірно вводять шляхом ін'єкції в основу хвоста 100 мкг антиген/CFA  
45 (RNB-5 для DR3-мишей; ТТГР для DR4-мишей). Контрольних мишей імунізують PBS/CFA. На 10 день дренажні LN і селезінки витягають і створюють одноклітинні суспензії. Деяку кількість клітин використовують для вимірювання антигеніндукованої клітинної проліферації, як розкрито вище. Спленоцити і LN-клітини, що залишилися, змішують, і CD4+Т-клітини виділяють, використовуючи набір для негативного очищення (незачеплені CD4+Т-клітини; Miltenyi, Leiden,  
50 The Netherlands). Потім CD4+Т-клітини культивують разом з антигеном (5 мкг/мл RNB-5 або 0,5 мкг/мл ТТГР-289-білка) і опроміненими спленоцитами (3000 рад) від DR3-мишей (відношення АПК:CD4+Т-клітини 1:1;  $5 \times 10^6$  клітин/мл). Клітини культивують у X-vivo 15 середовищі, щоб уникнути активації, індукованої фетальною телячою сироваткою (FCS). На 4 день до клітин додають 20 од./мл людських рекомбінантних IL-2 (R&D, Abingdon, United Kingdom). На 7 день  
55 живі клітини збирають, видаляючи мертві клітини, використовуючи поділ по градієнту щільності Фіколла (Histopaque 1083, Sigma-Aldrich). Потім клітини повторно стимулюють, як розкрито вище, змінюючи співвідношення АПК:CD4+Т-клітини на 2:1. На 9 день живі клітини збирають, і деяку кількість з них використовують для злиття. Інші CD4+Т-клітини залишають у культурі, і IL-2 додають у день 10. У день 14 живі клітини збирають, повторно стимулюють антигеном у

присутності АПК (відношення АПК:CD4+Т-клітини близько 3:1), і використовують для другого злиття в день 16.

#### Злиття

- 1×10<sup>7</sup> BW5147-клітин (Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, UK) і 5×10<sup>6</sup> CD4+Т-клітин змішують у 50-мл ампулі і промивають при 37°C у середовищі, що не містить сироватки. Після центрифугування клітинний осад обережно суспендують знову. 1 мл 37°C поліетиленгліколю (PEG; 40-50 % розчин, Sigma-Aldrich) додають протягом 45 секунд, зберігаючи клітини на невеликій водяній бані при 37°C. Клітини інкубують при 37°C протягом 45 секунд. Потім додають 1 мл 37°C середовища, що не містить сироватки, протягом 30 сек., при обертанні, потім додають 2, 3, 4, 10 і 30 мл послідовно. Ампули перевертають дуже повільно і інкубують при 37°C протягом 4 хвилин. Клітини центрифугують протягом 5 хвилин при швидкості 1300 об./хв. при кімнатній температурі (КТ) без перерви. Надосадову рідину видаляють, і 50 мл КТ середовища, що не містить сироватки, додають повільно, щоб уникнути перемішування з клітинним осадом. Стадію промивання повторюють, використовуючи повне середовище. І, нарешті, клітини знову суспендують у повному середовищі з 10 %-FCS при КТ і поміщають при різних концентраціях у 96-ямкові плоскодонні планшети (100 мкл/ямку). Через 48 годин клітини культивують у 1×гіпоксантин-аміноптерин-тимідиновому (НАТ, Sigma-Aldrich) середовищі, і ріст гібридом визначають приблизно через 6 днів. Клони культивують у НАТ-середовищі доти, поки вони є стабільними, потім переносять з гіпоксантин-тимідинового (НТ, Sigma-Aldrich) середовища в повне RPMI-середовище. Як звичайно клони заморожують у заморожувальному середовищі (90 % FCS+10 % ДМСО).

#### Оцінка антигенспецифічності клонів

- Гібридомні клітини культивують з 5×10<sup>4</sup> VAVY або BM14-клітинами (людські клітинні лінії, експресуючі HLA-DRB1\*0301 або HLA-DRB1\*0401, відповідно; International Histocompatibility Working Group, Seattle, USA) і антигеном (10-25 мкг/мл). Через 48 годин вимірюють антигеніндуковане продукування IL-2, використовуючи імуносорбентний ферментний аналіз (ELISA).

#### ELISA IL-2

- 96-ямкові планшети (Immunosorb 96 well, Fisher Scientific, Erembodegem, Belgium) покривають на ніч при 4°C 50 мкл/ямку очищеного агента захоплення Ab щурячих антимишачих IL-2 (BD Biosciences, Oxford, UK), розведеного 1:250 у карбонатному буфері. Після 2 промивань PBS-0,05 % Твін, ямки блокують 10 % FCS/PBS протягом 1 години при КТ. Потім ямки інкубують з 50 мкл/ямку надосадової рідини клітинної культури або IL-2-стандартом (BD Biosciences, Belgium, Erembodegem) протягом 2 годин при КТ. Планшети інкубують з 50 мкл/ямку біотин-щурячими антимишачими IL-2 (BD Biosciences), розведеними 1:1000 у 0 % FCS/PBS, протягом 1 години при КТ, з наступним інкубуванням з 50 мкл/ямку екстравідинпероксидази (Sigma-Aldrich), розведеної 1:1000 у PBS, протягом 30 хвилин при КТ. Для визначення зв'язування антитіл, додають розчин 50 мкл/ямку ТМБ-субстрату (Perbio Science, Erembodegem, Belgium). Через 11 хвилин реакцію забарвлення зупиняють, використовуючи 50 мкл/ямку 2М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптичну густину (ОГ) вимірюють на 450 нм (630 нм порівн.) (Tecan Benelux, Mechelen, Belgium).

#### Незалежна від процесингу система презентації антигену

- Антигенспецифічні клони тестують по їх реакційній здатності відносно 15-мерних пептидів (RNB-5A до 50), представлених фіксованим або не фіксованим VAVY- або BM14-клітинам (=АПК). 5×10<sup>4</sup> клітин з індивідуальних клонів культивують з 25 мкг/мл пептидів і 5×10<sup>4</sup> фіксованими або свіжими АПК. Для фіксації АПК клітини інкубують з 0,5 % параформальдегідом (Merck, Darmstadt, Germany) (pH 7) протягом 5 хвилин при КТ. Реакцію фіксації зупиняють, 0,4М гліцином (Sigma-Aldrich) і промивають одержані клітини в RPMI-10 % FCS. Додатково вимірюють реакційну здатність відносно людського ТТГР-289-білка (Chesapeake-PERL, Savage, Maryland, USA) для вимірювання криптичних епітопів. Через 48 годин вимірюють антигеніндуковане продукування IL-2 за допомогою ELISA.

#### Оцінка розчинності RNB-5-епітопів

- Розчинність пептидів аналізують, використовуючи Anabiotec (Zwijnaarde, Belgium). Коротко, зразки пептидів розчиняють у двох різних цільових концентраціях (1 мг/мл і 4 мг/мл), додаючи PBS, pH 7,0±0,1. Пептидні розчини інкубують при КТ протягом щонайменше 16 годин. Каламутність вимірюють на 320 і 360 нм, до і після центрифугування. Концентрацію пептидів визначають, використовуючи поглинання на 280 і 205 нм, і за даними ВЕРХ-УФ. Пептиди розчиняють у вихідній концентрації 20 мг/мл у ДМСО. Приготовляють серійні розведення до цільових концентрацій 4, 2 і 1 мг/мл у PBS. Пептидні розчини інкубують при КТ протягом 16-17 годин, щоб утворився осад. Помутніння оцінюють візуально, і поглинання вимірюють на 205 нм, 280 нм і 320 нм, використовуючи пристрій Nanodrop. Пептидні розчини центрифугують при

14800 об./хв. протягом 10 хвилин, і візуальну оцінку і вимірювання поглинання повторюють. Розраховують концентрацію пептидів, використовуючи наступну формулу:

$$\text{концентрація} \left( \frac{\text{мг}}{\text{мл}} \right) = \frac{A_{280}(\text{немаєод}) \times \text{Молекулярна маса (Да)}}{\text{Коефіцієнт екстинції} (\epsilon_{280}) (M_{-1} \text{ см}_{-1}) \times l (\text{см})}$$

5

Індукування толерантності обробкою RNB-5-апітопами

DR3-мишам підшкірно ін'єктують у потиличну частину шиї RNB-5 15-мерні пептиди (100 мкг/ін'єкцію) або PBS у дні -8, -6, -4 (схема високих доз) (Фіг. 5). Альтернативно, мишам вводять 0,1 мкг, 1 мкг і 10 мкг пептидів у дні -15, -13 і -11, відповідно, потім вводять 3 ін'єкції 1 пептиду в дні -8, -6 і -4 (схема збільшуваних доз). У день 0 мишам підшкірно вводять ін'єкцією в основу хвоста 100 мкг антиген/CFA (RNB-5-пептид або ТТГР-289-білок). Через 10 днів після імунізації, збирають дренажні LN і селезінки. Аналіз проліферації і вимірювання цитокінів здійснюють, як розкрито вище.

Модель ХГ на тваринах

Імунізація мишей ТТГР А-субодиничним аденовірусом

Аденовірус, експресуючий людські ТТГР А-субодиниці (амінокислотні залишки 1-289, А-субодиниця Ad) і контрольні аденовіруси (LacZ-Ad), експресуючі β-галактозидазу, закуповують у Viraquest (North Liberty, IA, USA). Шеститижневим самкам Balb/cJOLaHsd-мишей (Harlan Laboratories, Venray, The Netherlands) внутрішньом'язово ін'єктують у стегновий м'яз ТТГР-Ad ( $10^{10}$  або  $10^{11}$  частинок) або LacZ-Ad ( $10^{10}$  частинок). Усіх мишей імунізують одночасно, використовуючи одну і ту ж порцію вихідного аденовірусу. Мишам вводять ін'єкції три рази з тритижневими інтервалами (дні 0, 21 і 42), і кров відбирають до першої імунізації і через один тиждень після другої імунізації. Усіх мишей умертвляють через 4 тижні після третьої ін'єкції (10 тиждень) для одержання крові і щитовидних залоз.

Імунізація мишей ТТГР/CFA

Шеститижневих самок C57/BL6JOLaHsd-мишей (Harlan Laboratories) (8 мишей у групі) підшкірно імунізують ін'єкціями в основу хвоста 50 мкг ТТГР-289-білка, емульгованого в CFA з 4 мг/мл MTb (50 мл). У мишей відбирають кров із хвоста в дні 0 (преімунно), 7, 21, 35, 49, 63 (група А), у дні 0, 14, 28, 42, 56 (група В) або в дні 0, 21, 28, 42, 56 (група С). Мишам групи С проводять бустерну імунізацію на 4 тиждень, використовуючи 50 мкг ТТГР-289-білка, емульгованого в неповному ад'юванті Фрейнда (IFA). Через 10 тижнів після першої імунізації, усіх мишей умертвляють, і відбирають кров, використовуючи серцеву пункцію.

ТТГР антитіла

Анти-ТТГР антитіла (клас IgG) проти очищеного ТТГР-289-білка (Chesapeake-Perl) вимірюють, використовуючи ELISA. 96-ямкові планшети (половину площі 96-ямок, Fisher Scientific) покривають на ніч при 4°C 50 мкл/ямку ТТГР-289-білка в PBS (0,5 мкг/мл). Після промивання PBS-0,05 % Твін, ямки блокують 1 % BSA (мас./об.) у PBS протягом 1 години при 4°C, і інкубують з тестовою сироваткою (дублікатні аліквати, 1:50 розведення). Мишачі анти-ТТГР антитіла (A9, Abeam, Cambridge, UK) використовують як позитивний контроль. Зв'язування антитіл визначають, використовуючи кон'югований з пероксидазою хрому козячий антимишачий IgG (Abeam), і сигнал виявляють, використовуючи TMB. Оптичну густину (OD) вимірюють, використовуючи зчитувальний пристрій для планшетів на частоті 450 нм (Tecan Benelux).

Сироватковий тироксин і гістологія щитовидної залози

Повний тироксин (T4) вимірюють у нерозбавленій мишачій сироватці (10 мкл), використовуючи набір CBI мишачий/щурячий тироксин ELISA (Calbiotech, Spring Valley, CA, USA) відповідно до інструкцій виготовлювача. Значення T4 розраховують, використовуючи стандарти, представлені в наборі, і виражають як мкг/дл. Щитовидні залози фіксують у 10 % нейтральному буферованому формаліні (pH 7,5), розрізають на секції й забарвлюють гематоксиліном і еозином. Секції розглядають на предмет патологічних змін (гіпертрофія, гіперцелюлярність епітеліальних клітин і інфільтрація лімфоцитів) і проводять оцінку (KWS Biotest, Bristol, UK).

Таблиця 1

	Пептид	Послідовність	Розчинність	Індукована гібридомами реакція	Апітоп
RNB-5D-GKK	G0	KKGIYVSIDVTLQQLESHGKK	+	+++	+
	G1	KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK	++	++	+
	G2	KKGIKVSIDVTLQQLESHGKK	+	+	+
	G3	KKGIYKSIDVTLQQLESHGKK	++++	+	+
	G4	KKGIYVKIDVTLQQLESHGKK	+	-	-
	G5	KKGIYVSKDVTLQQLESHGKK	ND	-	-
	G6	KKGIYVSIKVTLQQLESHGKK	ND	-	-
	G7	KKGIYVSIDKTLQQLESHGKK	ND	-	-
	G8	KKGIYVSIDVKLQQLESHGKK	+	+++	+
	G9	KKGIYVSIDVTKQQLESHGKK	ND	-	-
	G10	KKGIYVSIDVTLKQLESHGKK	ND	-+	-
	G11	KKGIYVSIDVTLQKLESHGKK	+	+++	+
	G12	KKGIYVSIDVTLQQKESHGKK	+	+++	+
	G13	KKGIYVSIDVTLQQLKSHGKK	+	+++	+
	G14	KKGIYVSIDVTLQQLEKHGKK	+	+++	+
	G15	KKGIYVSIDVTLQQLESKGKK	+	+++	+
	G16	KKGYVSIDVTLQQLEGKK	++	++	+
	G17	KKGYVSIDVKLQQLEGKK	++++	++	+
	G18	KKGYVSIDVTLQKLEGKK	++++	+++	+
	G19	KKGYVSIDVTLQQKEGKK	++++	++	+
	G20	KKGYVSIDVKLQKKEGKK	++++	+	+
	G21	KKGIYVSIDVTLQQLEGKK	+	+++	+
	G22	KKGIYVSIDVKLQQLEGKK	+	+++	+
	G23	KKGIYVSIDVTLQKLEGKK	+	+++	+
	G24	KKGIYVSIDVTLQQKEGKK	+	+++	+
	G25	KKGIYVSIDVKLQKKEGKK	+++	++	+
	G26	KKGTYSIDVTLQQLEGKK	+	+++	+
	G27	KKGTYSIDVKLQQLEGKK	++++	++	+
	G28	KKGTYSIDVTLQKLEGKK	+	+++	+
	G29	KKGTYSIDVTLQQKEGKK	+	++	+
	G30	KKGTYSIDVKLQKKEGKK	++++	++	+
	M1	KKGIYLSIDATLQRLEPHGKK	+	-	-

RNB-5D-KKK	K0	KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK	+	+++	+
	K1	KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK	++++	++	+
	K2	KKKIKVSIDVTLQQLESHKKK	+	-+	+
	K3	KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK	++++	+	+
	K4	KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK	+++	-+	+
	K5	KKKIYVSKDVTLQQLESHKKK	ND	-	-
	K6	KKKIYVSIKVTLQQLESHKKK	ND	-	-
	K7	KKKIYVSIDKTLQQLESHKKK	ND	-	-
	K8	KKKIYVSIDVKLQQLESHKKK	+	+++	+
	K9	KKKIYVSIDVTKQQLESHKKK	ND	-	-
	K10	KKKIYVSIDVTLKQLESHKKK	ND	+	+
	K11	KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK	+	+++	+
	K12	KKKIYVSIDVTLQQKESHKKK	+	+++	+
	K13	KKKIYVIDVTLQQLKSHKKK	+	+++	+
	K14	KKKIYVSIDVTLQQLEKHKKK	+	+++	+
	K15	KKKIYVSIDVTLQQLESKKKK	+	+++	+

RNB-5D-KKK	K0	KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK	+	+++	+
	K16	KKKYVSIDVTLQQLEKKK	++++	++	+
	K17	KKKYVSIDVKLQQLEKKK	++	++	+
	K18	KKKYVSIDVTLQKLEKKK	+	++	+
	K19	KKKYVSIDVTLQQKEKKK	++++	++	+
	K20	KKKYVSIDVKLQKKEKKK	+++	+	+

Т-клітинні лінії людських PBMC (Приклад 5)

Моноцити периферичної крові (PBMC) здорових донорів або пацієнтів із хворобою Грейвса виділяють (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) і заморожують аліквотами. У день 0, клітини розморожують, і  $10^6$  PBMC/мл культивують з 20 мкг/мл пептиду в доповненому (10 mM HEPES, 50 од./мл пеніцилін/стрептоміцину і 4 mM L-глутаміну (Lonza)) RPMI 1640 (Lonza) з 5 % АВ сироваткою (Sigma Aldrich), доданою в 6-ямковий планшет (Greiner Bio-one), і інкубують при 37°C і 5 % CO<sub>2</sub>. Через 7 днів rhIL-2 (R&D Systems) додають до кінцевої концентрації 20 од./мл. На 12 день клітини збирають, промивають і знову повертають у культуру при концентрації  $10^6 + 2 \times 10^6$  нових розморожених опромінених аутологусних PBMCs/мл у 6 ямковому планшеті, стимульованих 5-10 мкг/мл пептиду і 20 од./мл rhIL-2. У дні 15, 18 і 21 додають додатково rhIL-2 до кінцевої концентрації 20 од./мл.

У день 24 клітини збирають, промивають і  $2 \times 10^4$  культивують у 96-ямковому круглодонному планшеті (Cellstar, Greiner Bio One) з  $10^5$  опроміненими аутологусними PBMC і VAVY/BM14/MGAR людською клітинною лінією, експресуючою людські молекули МНС класу II (International Histocompatibility Working Group, Seattle, US), у доповненому RPMI+5 % АВ сироваткою в присутності різних антигенів (пептиди, білок) у концентраціях 5-50 мкг/мл. Культури інкубують протягом 48 годин з 0,5 мкКюрі/ямку 3H-тимідину (Perkin Elmer), доданого в останні 18 годин. Після заморожування планшетів клітини збирають і зчитують значення, використовуючи β-лічильник (Wallac 1450 Microbeta Trilux) для оцінки проліферації. Перед додаванням 3H-тимідину відбирають 60 мкл/ямку клітинних культур для аналізу цитокінів.

ELISA IFN-гамма

Надосадкові рідини TCL-культур оцінюють по вмісту IFN-гамма, використовуючи набір Human IFN-gamma Duoset kit, R&D Systems, відповідно до інструкцій виготовлювачів. Оптичну густину вимірюють на довжині хвилі 450 нм (Tecan Benelux).

Усі публікації, згадані в наведеному вище описі, включені в опис по посиланню. Різні модифікації і варіації розкритих способів і систем даного винаходу будуть очевидні фахівцям у даній галузі, не виходячи за рамки обсягу і суті винаходу. Хоча даний винахід був розкритий у зв'язку з конкретними переважними варіантами, потрібно розуміти, що даний винахід у тому вигляді, як він заявлений, не слід несправедливо обмежувати такими конкретними варіантами. У дійсності, різні модифікації розкритих способів здійснення винаходу, що очевидні фахівцям у молекулярній біології, імунології або споріднених областях, повинні бути включені в обсяг наведеної формули винаходу.

#### СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Apitope International NV

<120> ПЕПТИДИ

<130> P100537PCT

<140> PCT/IB2014/063739

<141> 2014-08-06

<150> GB1314052.0

<151> 2013-08-06

<160> 134

<170> Варіант патенту 3.5

<210> 1



```

<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 1

Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu
1          5          10          15

10 Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His Ile
    20          25

<210> 2
<211> 29
15 <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 2

20 Leu Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser
   1          5          10          15

   Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu
   20          25

25 <210> 3
    <211> 29
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

30 <400> 3

    Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp
    1          5          10          15

35 Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met
    20          25

    <210> 4
40 <211> 12
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 4

45 Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu
   1          5          10

    <210> 5
50 <211> 764
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 5

55 Met Arg Pro Ala Asp Leu Leu Gln Leu Val Leu Leu Leu Asp Leu Pro
   1          5          10          15

    Arg Asp Leu Gly Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His
60 20          25          30

```

# UA 120746 C2

	Gln	Glu	Glu	Asp	Phe	Arg	Val	Thr	Cys	Lys	Asp	Ile	Gln	Arg	Ile	Pro	
			35					40					45				
5	Ser	Leu	Pro	Pro	Ser	Thr	Gln	Thr	Leu	Lys	Leu	Ile	Glu	Thr	His	Leu	
		50					55					60					
	Arg	Thr	Ile	Pro	Ser	His	Ala	Phe	Ser	Asn	Leu	Pro	Asn	Ile	Ser	Arg	
	65					70					75					80	
10	Ile	Tyr	Val	Ser	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Gln	Gln	Leu	Glu	Ser	His	Ser	
					85					90					95		
	Phe	Tyr	Asn	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	His	Ile	Glu	Ile	Arg	Asn	Thr	Arg	
				100					105					110			
15	Asn	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	Pro	Asp	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	
			115					120					125				
	Lys	Phe	Leu	Gly	Ile	Phe	Asn	Thr	Gly	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Asp	Leu	
20		130					135					140					
	Thr	Lys	Val	Tyr	Ser	Thr	Asp	Ile	Phe	Phe	Ile	Leu	Glu	Ile	Thr	Asp	
	145					150					155					160	
25	Asn	Pro	Tyr	Met	Thr	Ser	Ile	Pro	Val	Asn	Ala	Phe	Gln	Gly	Leu	Cys	
					165					170					175		
	Asn	Glu	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Leu	Tyr	Asn	Asn	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	
				180					185					190			
30	Gln	Gly	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Ala	Val	Tyr	Leu	Asn	
			195					200					205				
	Lys	Asn	Lys	Tyr	Leu	Thr	Val	Ile	Asp	Lys	Asp	Ala	Phe	Gly	Gly	Val	
35		210					215					220					
	Tyr	Ser	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	
	225					230					235					240	
40	Leu	Pro	Ser	Lys	Gly	Leu	Glu	His	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Asn	
					245					250					255		
	Thr	Trp	Thr	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	His	Leu	
				260					265					270			
45	Thr	Arg	Ala	Asp	Leu	Ser	Tyr	Pro	Ser	His	Cys	Cys	Ala	Phe	Lys	Asn	
			275					280					285				
	Gln	Lys	Lys	Ile	Arg	Gly	Ile	Leu	Glu	Ser	Leu	Met	Cys	Asn	Glu	Ser	
50		290					295					300					
	Ser	Met	Gln	Ser	Leu	Arg	Gln	Arg	Lys	Ser	Val	Asn	Ala	Leu	Asn	Ser	
	305					310					315					320	
55	Pro	Leu	His	Gln	Glu	Tyr	Glu	Glu	Asn	Leu	Gly	Asp	Ser	Ile	Val	Gly	
					325					330					335		
	Tyr	Lys	Glu	Lys	Ser	Lys	Phe	Gln	Asp	Thr	His	Asn	Asn	Ala	His	Tyr	
				340					345					350			
60	Tyr	Val	Phe	Phe	Glu	Glu	Gln	Glu	Asp	Glu	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly	Gln	

# UA 120746 C2

	355						360						365						
5	Glu	Leu	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Gln	Ala	Phe	Asp	Ser	His			
	370						375						380						
	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Ile	Cys	Gly	Asp	Ser	Glu	Asp	Met	Val	Cys	Thr	Pro			
	385						390						395						400
10	Lys	Ser	Asp	Glu	Phe	Asn	Pro	Cys	Glu	Asp	Ile	Met	Gly	Tyr	Lys	Phe			
	405						410						415						
	Leu	Arg	Ile	Val	Val	Trp	Phe	Val	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Asn			
	420						425						430						
15	Val	Phe	Val	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Thr	Ser	His	Tyr	Lys	Leu	Asn	Val			
	435						440						445						
	Pro	Arg	Phe	Leu	Met	Cys	Asn	Leu	Ala	Phe	Ala	Asp	Phe	Cys	Met	Gly			
20	450						455						460						
	Met	Tyr	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Leu	Tyr	Thr	His	Ser	Glu			
	465						470						475						480
25	Tyr	Tyr	Asn	His	Ala	Ile	Asp	Trp	Gln	Thr	Gly	Pro	Gly	Cys	Asn	Thr			
	485						490						495						
	Ala	Gly	Phe	Phe	Thr	Val	Phe	Ala	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Tyr	Thr	Leu			
	500						505						510						
30	Thr	Val	Ile	Thr	Leu	Glu	Arg	Trp	Tyr	Ala	Ile	Thr	Phe	Ala	Met	Arg			
	515						520						525						
	Leu	Asp	Arg	Lys	Ile	Arg	Leu	Arg	His	Ala	Cys	Ala	Ile	Met	Val	Gly			
	530						535						540						
35	Gly	Trp	Val	Cys	Cys	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Gly	Ile			
	545						550						555						560
	Ser	Ser	Tyr	Ala	Lys	Val	Ser	Ile	Cys	Leu	Pro	Met	Asp	Thr	Glu	Thr			
	565						570						575						
40	Pro	Leu	Ala	Leu	Ala	Tyr	Ile	Val	Phe	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Ile	Val			
	580						585						590						
	Ala	Phe	Val	Ile	Val	Cys	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys	Ile	Tyr	Ile	Thr	Val			
	595						600						605						
50	Arg	Asn	Pro	Gln	Tyr	Asn	Pro	Gly	Asp	Lys	Asp	Thr	Lys	Ile	Ala	Lys			
	610						615						620						
	Arg	Met	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Thr	Asp	Phe	Ile	Cys	Met	Ala	Pro	Ile			
	625						630						635						640
55	Ser	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu	Asn	Lys	Pro	Leu	Ile	Thr	Val			
	645						650						655						
	Ser	Asn	Ser	Lys	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Tyr	Pro	Leu	Asn	Ser	Cys			
	660						665						670						
60	Ala	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ala	Ile	Phe	Thr	Lys	Ala	Phe	Gln	Arg	Asp			
	675						680						685						

	Val	Phe	Ile	Leu	Leu	Ser	Lys	Phe	Gly	Ile	Cys	Lys	Arg	Gln	Ala	Gln
	690						695					700				
5	Ala	Tyr	Arg	Gly	Gln	Arg	Val	Pro	Pro	Lys	Asn	Ser	Thr	Asp	Ile	Gln
	705					710					715					720
	Val	Gln	Lys	Val	Thr	His	Asp	Met	Arg	Gln	Gly	Leu	His	Asn	Met	Glu
					725					730					735	
10	Asp	Val	Tyr	Glu	Leu	Ile	Glu	Asn	Ser	His	Leu	Thr	Pro	Lys	Lys	Gln
				740				745						750		
	Gly	Gln	Ile	Ser	Glu	Glu	Tyr	Met	Gln	Thr	Val	Leu				
15			755					760								
	<210>	6														
	<211>	15														
	<212>	PRT														
20	<213>	Homo sapiens														
	<400>	6														
	Ile	Ser	Arg	Ile	Tyr	Val	Ser	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Gln	Gln	Leu	
25	1				5					10					15	
	<210>	7														
	<211>	15														
	<212>	PRT														
30	<213>	Homo sapiens														
	<400>	7														
	Ser	Arg	Ile	Tyr	Val	Ser	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Gln	Gln	Leu	Glu	
35	1				5					10					15	
	<210>	8														
	<211>	15														
	<212>	PRT														
40	<213>	Homo sapiens														
	<400>	8														
	Arg	Ile	Tyr	Val	Ser	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Gln	Gln	Leu	Glu	Ser	
45	1				5					10					15	
	<210>	9														
	<211>	15														
	<212>	PRT														
50	<213>	Homo sapiens														
	<400>	9														
	Ile	Tyr	Val	Ser	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Gln	Gln	Leu	Glu	Ser	His	
55	1				5					10					15	
	<210>	10														
	<211>	15														
	<212>	PRT														
60	<213>	Homo sapiens														

<400> 10

Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser  
 1 5 10 15

5 <210> 11  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 11

Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe  
 1 5 10 15

15 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

20 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

<400> 12

25 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15

30 Ser His Gly Lys Lys  
 20

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 35 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

40 <400> 13

Lys Lys Gly Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser  
 1 5 10 15

45 His Ser Gly Lys Lys  
 20

<210> 14  
 <211> 21  
 50 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

55 <400> 14

Lys Lys Gly Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His  
 1 5 10 15

60 Ser Phe Gly Lys Lys

20

5 <210> 15  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 15  
  
 10 Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val  
 1 5 10 15  
  
 <210> 16  
 <211> 21  
 15 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 20  
 <400> 16  
  
 Lys Lys Gly Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile  
 1 5 10 15  
 25 Asp Val Gly Lys Lys  
 20  
  
 <210> 17  
 30 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 17  
 35 Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr  
 1 5 10 15  
  
 <210> 18  
 40 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 18  
 45 Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp  
 1 5 10 15  
  
 <210> 19  
 50 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 19  
 55 Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp Ile  
 1 5 10 15  
  
 <210> 20  
 60 <211> 15  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

5 Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp Ile Phe  
1 5 10 15

<210> 21  
<211> 21  
10 <212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> TSHR пептидний варіант

15 <400> 21

Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
1 5 10 15

20 Ser His Lys Lys Lys  
20

<210> 22  
25 <211> 21  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
30 <223> TSHR пептидний варіант

<400> 22

Lys Lys Gly Lys Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
35 1 5 10 15

Ser His Gly Lys Lys  
20

40 <210> 23  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

45 <220>  
<223> TSHR пептидний варіант

<400> 23

50 Lys Lys Gly Ile Lys Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
1 5 10 15

Ser His Gly Lys Lys  
20

55 <210> 24  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

60 <220>

<223> TSHR пептидний варіант

<400> 24

5 Lys Lys Gly Ile Tyr Lys Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
1 5 10 15

Ser His Gly Lys Lys  
20

10 <210> 25  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

15 <220>  
<223> TSHR пептидний варіант

<400> 25

20 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Gln Leu Glu  
1 5 10 15

Ser His Gly Lys Lys  
20

25 <210> 26  
<211> 21  
<212> PRT  
30 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> TSHR пептидний варіант

35 <400> 26

Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Lys Leu Glu  
1 5 10 15

40 Ser His Gly Lys Lys  
20

<210> 27  
<211> 21  
45 <212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> TSHR пептидний варіант

50 <400> 27

Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Lys Glu  
1 5 10 15

55 Ser His Gly Lys Lys  
20

<210> 28  
60 <211> 21  
<212> PRT



<213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 5 <400> 28  
 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Lys  
 1 5 10 15  
 10 Ser His Gly Lys Lys  
 20  
 <210> 29  
 15 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 20 <223> TSHR пептидний варіант  
 <400> 29  
 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
 25 Lys His Gly Lys Lys  
 20  
 30 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 35 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 <400> 30  
 40 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Gly Lys Lys  
 20  
 45 <210> 31  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 50 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 <400> 31  
 55 Lys Lys Gly Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Lys  
 60

<210> 32  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 5  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 <400> 32  
 10  
 Lys Lys Gly Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Gln Leu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Lys  
 15  
 <210> 33  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 20 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 25 <400> 33  
 Lys Lys Gly Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Lys Leu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 30 Lys Lys  
 <210> 34  
 <211> 18  
 35 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 40 <400> 34  
 Lys Lys Gly Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Lys Glu Gly  
 1 5 10 15  
 45 Lys Lys  
 <210> 35  
 50 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 55 <223> TSHR пептидний варіант  
 <400> 35  
 Lys Lys Gly Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Lys Lys Glu Gly  
 60 1 5 10 15

Lys Lys

- 5 <210> 36  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність
- <220>  
 10 <223> TSHR пептидний варіант
- <400> 36
- Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 15 1 5 10 15
- Gly Lys Lys
- 20 <210> 37  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність
- 25 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант
- <400> 37
- 30 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15
- Gly Lys Lys
- 35 <210> 38  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність
- 40 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант
- <400> 38
- 45 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Lys Leu Glu  
 1 5 10 15
- Gly Lys Lys
- 50 <210> 39  
 <211> 19  
 <212> PRT
- 55 <213> Штучна послідовність
- <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант
- 60 <400> 39

Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Lys Glu  
1 5 10 15

Gly Lys Lys

5

<210> 40  
<211> 19  
<212> PRT  
10 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> TSHR пептидний варіант

15 <400> 40

Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Lys Lys Glu  
1 5 10 15

20 Gly Lys Lys

<210> 41  
<211> 19  
25 <212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> TSHR пептидний варіант

30 <400> 41

Lys Lys Gly Thr Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
1 5 10 15

35 Gly Lys Lys

<210> 42  
<211> 19  
40 <212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
45 <223> TSHR пептидний варіант

<400> 42

Lys Lys Gly Thr Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Gln Leu Glu  
50 1 5 10 15

Gly Lys Lys

55 <210> 43  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

60 <220>  
<223> TSHR пептидний варіант

<400> 43

5 Lys Lys Gly Thr Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Lys Leu Glu  
1 5 10 15

Gly Lys Lys

10 <210> 44  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

15 <220>  
<223> TSHR пептидний варіант

<400> 44

20 Lys Lys Gly Thr Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Lys Glu  
1 5 10 15

Gly Lys Lys

25 <210> 45  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

30 <220>  
<223> TSHR пептидний варіант

<400> 45

35 Lys Lys Gly Thr Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Lys Lys Glu  
1 5 10 15

Gly Lys Lys

40 <210> 46  
<211> 21  
<212> PRT  
45 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> TSHR пептидний варіант

50 <400> 46

Lys Lys Lys Lys Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
1 5 10 15

55 Ser His Lys Lys Lys  
20

<210> 47  
<211> 21  
60 <212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

5 <400> 47

Lys Lys Lys Ile Lys Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15

10 Ser His Lys Lys Lys  
 20

<210> 48  
 <211> 21  
 15 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

20 <400> 48

Lys Lys Lys Ile Tyr Lys Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15

25 Ser His Lys Lys Lys  
 20

<210> 49  
 30 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 35 <223> TSHR пептидний варіант

<400> 49

Lys Lys Lys Ile Tyr Val Lys Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15

Ser His Lys Lys Lys  
 20

45 <210> 50  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

50 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

<400> 50

55 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15

Ser His Lys Lys Lys  
 20

60 <210> 51

<211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 5 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 <400> 51  
 10 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Lys Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Ser His Lys Lys Lys  
 20  
 15 <210> 52  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 20 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 <400> 52  
 25 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Lys Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Ser His Lys Lys Lys  
 20  
 30 <210> 53  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 40 <400> 53  
 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Lys Glu  
 1 5 10 15  
 45 Ser His Lys Lys Lys  
 20  
 <210> 54  
 <211> 21  
 50 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 55 <400> 54  
 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Lys  
 1 5 10 15  
 60 Ser His Lys Lys Lys

20

5 <210> 55  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 10 <400> 55  
  
 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
 15 Lys His Lys Lys Lys  
 20  
  
 20 <210> 56  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 25 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 <400> 56  
  
 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 30 1 5 10 15  
  
 Ser Lys Lys Lys Lys  
 20  
  
 35 <210> 57  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 40 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 <400> 57  
  
 45 Lys Lys Lys Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Lys  
 1 5 10 15  
  
 Lys Lys  
  
 50 <210> 58  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 55 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 <400> 58  
 60 Lys Lys Lys Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Gln Leu Glu Lys



1 5 10 15

Lys Lys

5

<210> 59  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

10

<220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

<400> 59

15

Lys Lys Lys Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Lys Leu Glu Lys  
 1 5 10 15

Lys Lys

20

<210> 60  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

25

<220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

<400> 60

30

Lys Lys Lys Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Lys Glu Lys  
 1 5 10 15

35

Lys Lys

<210> 61  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

40

<220>  
 <223> TSHR пептидний варіант

45

<400> 61

Lys Lys Lys Tyr Val Ser Ile Asp Val Lys Leu Gln Lys Lys Glu Lys  
 1 5 10 15

50

Lys Lys

<210> 62  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55

<400> 62

60

Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr

	1	5	10	15
	<210> 63			
	<211> 21			
5	<212> PRT			
	<213> Штучна послідовність			
	<220>			
10	<223> TSHR пептидний варіант			
	<400> 63			
	Lys Lys Gly Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp			
	1 5 10 15			
15	Val Thr Gly Lys Lys			
		20		
	<210> 64			
20	<211> 28			
	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 64			
25				
	Leu Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr			
	1 5 10 15			
	Ala Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu			
30		20 25		
	<210> 65			
	<211> 15			
	<212> PRT			
35	<213> Homo sapiens			
	<400> 65			
	Leu Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly			
40	1 5 10 15			
	<210> 66			
	<211> 15			
	<212> PRT			
45	<213> Homo sapiens			
	<400> 66			
	Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr			
50	1 5 10 15			
	<210> 67			
	<211> 21			
	<212> PRT			
55	<213> Homo sapiens			
	<400> 67			
	Lys Lys Lys Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln			
60	1 5 10 15			

Gly Tyr Lys Lys Lys  
20

5 <210> 68  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 68  
Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala  
1 5 10 15

15 <210> 69  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 69  
Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe  
1 5 10 15

25 <210> 70  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 70  
Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe Asn  
1 5 10 15

35 <210> 71  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40 <400> 71  
Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe Asn Gly  
1 5 10 15

45 <210> 72  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50 <400> 72  
Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe Asn Gly Thr  
1 5 10 15

55 <210> 73  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

60 <400> 73  
Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Lys

# UA 120746 C2

	1		5		10		15									
	<210> 74															
	<211> 15															
5	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 74															
10	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Gln	Gly	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Lys	Leu	
	1				5					10					15	
	<210> 75															
	<211> 15															
15	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 75															
20	Phe	Thr	Ser	Val	Gln	Gly	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	
	1				5					10					15	
	<210> 76															
	<211> 15															
25	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 76															
30	Thr	Ser	Val	Gln	Gly	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Ala	
	1				5					10					15	
	<210> 77															
	<211> 15															
35	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 77															
40	Ser	Val	Gln	Gly	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Ala	Val	
	1				5					10					15	
	<210> 78															
	<211> 15															
45	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 78															
50	Val	Gln	Gly	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Ala	Val	Tyr	
	1				5					10					15	
	<210> 79															
	<211> 29															
55	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 79															
60	Gly	Gly	Met	Gly	Cys	Ser	Ser	Pro	Pro	Cys	Glu	Cys	His	Gln	Glu	Glu
	1				5					10					15	

Asp Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro  
20 25

5 <210> 80  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 80

Glu Glu Asp Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser  
1 5 10 15

15 Leu Pro Pro Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His  
20 25 30

<210> 81  
<211> 30  
20 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 81

25 Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu  
1 5 10 15

Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile  
20 25 30

30 <210> 82  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 82

Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile  
1 5 10 15

40 Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr Ile Asp Pro Asp Ala  
20 25

<210> 83  
45 <211> 29  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 83

50 Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr Ile Asp Pro Asp Ala Leu  
1 5 10 15

Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly Ile Phe Asn  
55 20 25

<210> 84  
<211> 29  
<212> PRT  
60 <213> Homo sapiens

<400> 84

Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly Ile Phe Asn Thr Gly  
 1 5 10 15

5 Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr  
 20 25

<210> 85  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 85

15 Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr  
 1 5 10 15

20 Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr  
 20 25 30

<210> 86  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 86

30 Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu  
 1 5 10 15

Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val  
 20 25

35 <210> 87  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 87

Gln Gly Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15

45 Lys Asn Lys Tyr Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala  
 20 25

<210> 88  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 88

55 Asn Lys Asn Lys Tyr Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly  
 1 5 10 15

Val Tyr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln  
 20 25

60 <210> 89

<211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 89  
 Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr  
 1 5 10 15  
 10 Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys Gly Leu Glu His  
 20 25  
 <210> 90  
 <211> 28  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 90  
 20 Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys Gly Leu Glu His Leu Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys Lys Leu  
 20 25  
 25 <210> 91  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 91  
 Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys Lys Leu Pro  
 1 5 10 15  
 35 Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp  
 20 25  
 <210> 92  
 40 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 92  
 45 Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp Leu Ser Tyr  
 1 5 10 15  
 Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Lys Asn Gln Lys Lys  
 50 20 25  
 <210> 93  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens  
 <400> 93  
 Leu Ser Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Lys Asn Gln Lys Lys Ile  
 60 1 5 10 15

Arg Gly Ile Leu Glu Ser Leu Met Cys Asn Glu Ser  
20 25

5 <210> 94  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 94

Ile Arg Gly Ile Leu Glu Ser Leu Met Cys Asn Glu Ser Ser Met Gln  
1 5 10 15

15 Ser Leu Arg Gln Arg Lys Ser Val Asn Ala Leu Asn  
20 25

20 <210> 95  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 95

25 Ser Met Gln Ser Leu Arg Gln Arg Lys Ser Val Asn Ala Leu Asn Ser  
1 5 10 15

Pro Leu His Gln Glu Tyr Glu Glu Asn Leu Gly Asp Ser  
20 25

30 <210> 96  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 96

Ser Pro Leu His Gln Glu Tyr Glu Glu Asn Leu Gly Asp Ser Ile Val  
1 5 10 15

40 Gly Tyr Lys Glu Lys Ser Lys Phe Gln Asp Thr His Asn  
20 25

45 <210> 97  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 97

50 Ile Val Gly Tyr Lys Glu Lys Ser Lys Phe Gln Asp Thr His Asn Asn  
1 5 10 15

Ala His Tyr Tyr Val Phe Phe Glu Glu Gln Glu Asp Glu  
20 25

55 <210> 98  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

60 <400> 98



# UA 120746 C2

```

Asn Ala His Tyr Tyr Val Phe Phe Glu Glu Gln Glu Asp Glu Ile Ile
1          5          10          15

5  Gly Phe Gly Gln Glu Leu Lys Asn Pro Gln Glu Glu Thr
    20          25

<210> 99
<211> 29
10 <212> PRT
    <213> Homo sapiens

<400> 99

15 Ile Ile Gly Phe Gly Gln Glu Leu Lys Asn Pro Gln Glu Glu Thr Leu
    1          5          10          15

    Gln Ala Phe Asp Ser His Tyr Asp Tyr Thr Ile Cys Gly
    20          25

20 <210> 100
    <211> 29
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

25 <400> 100

    Leu Gln Ala Phe Asp Ser His Tyr Asp Tyr Thr Ile Cys Gly Asp Ser
    1          5          10          15

30 Glu Asp Met Val Cys Thr Pro Lys Ser Asp Glu Phe Asn
    20          25

    <210> 101
35 <211> 27
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 101

40 Asp Ser Glu Asp Met Val Cys Thr Pro Lys Ser Asp Glu Phe Asn Pro
    1          5          10          15

    Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Lys Phe Leu Arg
45 20          25

    <210> 102
    <211> 29
    <212> PRT
50 <213> Homo sapiens

    <400> 102

    Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr Leu Thr Val Ile
55 1          5          10          15

    Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro Ser
    20          25

60 <210> 103
    <211> 15

```

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 103  
 5 Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr  
 1 5 10 15  
  
 <210> 104  
 10 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 104  
 15 Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn  
 1 5 10 15  
  
 <210> 105  
 20 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 105  
 25 Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu  
 1 5 10 15  
  
 <210> 106  
 30 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 106  
 35 Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
  
 <210> 107  
 40 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 107  
 45 Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys  
 1 5 10 15  
  
 <210> 108  
 50 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 108  
 55 Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
  
 <210> 109  
 60 <211> 15  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

5 Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr  
1 5 10 15

<210> 110  
<211> 15  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 110

15 Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His  
1 5 10 15

<210> 111  
<211> 15  
20 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 111

25 Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His Ile  
1 5 10 15

<210> 112  
<211> 21  
30 <212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> TSHR пептидний варіант

35 <400> 112

Lys Lys Gly Ile Tyr Val Lys Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
1 5 10 15

40 Ser His Gly Lys Lys  
20

<210> 113  
<211> 21  
45 <212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
50 <223> TSHR пептидний варіант

<400> 113

Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Lys Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
1 5 10 15

Ser His Gly Lys Lys  
20

60 <210> 114  
<211> 21

<212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 5 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 <400> 114  
  
 10 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Lys Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
  
 Ser His Gly Lys Lys  
 20  
  
 15 <210> 115  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 20 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 <400> 115  
  
 25 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Lys Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
  
 Ser His Gly Lys Lys  
 20  
  
 30 <210> 116  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 35 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 <400> 116  
  
 40 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Lys Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
  
 Ser His Gly Lys Lys  
 20  
  
 45 <210> 117  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 50 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 55 <400> 117  
  
 Lys Lys Gly Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Lys Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
  
 60 Ser His Gly Lys Lys  
 20

<210> 118  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 5 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 10 <400> 118  
  
 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Lys Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
  
 15 Ser His Lys Lys Lys  
 20  
  
 <210> 119  
 <211> 21  
 20 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
 25  
 <400> 119  
  
 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Lys Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15  
 30  
 Ser His Lys Lys Lys  
 20  
  
 <210> 120  
 35 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 40 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 <400> 120  
  
 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Lys Thr Leu Gln Gln Leu Glu  
 45 1 5 10 15  
  
 Ser His Lys Lys Lys  
 20  
  
 50 <210> 121  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 55 <220>  
 <223> TSHR пептидний варіант  
  
 <400> 121  
  
 60 Lys Lys Lys Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Lys Gln Gln Leu Glu  
 1 5 10 15

Ser His Lys Lys Lys  
20

5 <210> 122  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 122

Leu Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile  
1 5 10 15

15 <210> 123  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 123

Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser  
1 5 10 15

25 <210> 124  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 124

Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg  
1 5 10 15

35 <210> 125  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40 <400> 125

Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile  
1 5 10 15

45 <210> 126  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50 <400> 126

Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr  
1 5 10 15

55 <210> 127  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

60 <400> 127

# UA 120746 C2

```

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val
1          5          10          15

5  <210> 128
   <211> 15
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

10 <400> 128
   His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser
   1          5          10          15

15 <210> 129
   <211> 15
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

20 <400> 129
   Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile
   1          5          10          15

25 <210> 130
   <211> 15
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

30 <400> 130
   Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp
   1          5          10          15

35 <210> 131
   <211> 15
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

40 <400> 131
   Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu
   1          5          10          15

45 <210> 132
   <211> 15
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

50 <400> 132
   Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln
   1          5          10          15

55 <210> 133
   <211> 15
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

60 <400> 133
   Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln

```

1 5 10 15

<210> 134

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> TSHR пептидний варіант

10

<400> 134

Lys Lys Gly Ile Tyr Leu Ser Ile Asp Ala Thr Leu Gln Arg Leu Glu

1 5 10 15

15

Pro His Gly Lys Lys

20

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

20

1. Пептид, який здатний до зв'язування з молекулою МНС *in vitro* і може бути представлений Т-клітинам без процесингу антигену, який вибирають з наступних пептидів рецептора тиреотропного гормону (ТТГР):

RNB\_5D-GKK: KKGIVVSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 12),

25 RNB\_5D-KKK: KKKIYVSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 21),

RNB\_5E-GKK: KKGIVVSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 13),

RNB\_5A: ISRIYVSIDVTLLQQL (SEQ ID NO: 6),

RNB\_5B: SRIYVSIDVTLLQQL (SEQ ID NO: 7),

RNB\_5C: RIYVSIDVTLLQQL (SEQ ID NO: 8),

30 RNB\_5D: IYVSIDVTLLQQLSH (SEQ ID NO: 9),

RNB\_4K-GKK: KKGNLPNISRIYVSIDVTGKK (SEQ ID NO: 63),

RNB\_9B: GLKMFPDLTKVYST (SEQ ID NO: 18),

RNB\_9C: LKMFPDLTKVYSTDI (SEQ ID NO: 19),

RNB\_12B-KKK: KKKTLKLYNNGFTSVQGYKKK (SEQ ID NO: 67).

35 2. Пептид, який здатний до зв'язування з молекулою МНС *in vitro* і може бути представлений Т-клітинам без процесингу антигену, який **відрізняється** тим, що пептид вибирають з наступної групи:

KKGIVVSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 12),

KKGKYVSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 22),

40 KKGIVKSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 23),

KKGIVKSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 24),

KKGIVVSIDVLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 25),

KKGIVVSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 26),

KKGIVVSIDVTLLQQLSHGKK (SEQ ID NO: 27),

45 KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 28),

KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 29),

KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 30),

KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 31),

KKGIVVSIDVLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 32),

50 KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 33),

KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 34),

KKGIVVSIDVLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 35),

KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 36),

KKGIVVSIDVLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 37),

55 KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 38),

KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 39),

KKGIVVSIDVLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 40),

KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 41),

KKGIVVSIDVLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 42),

60 KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 43),

KKGIVVSIDVTLLQQLKSHGKK (SEQ ID NO: 44),



KKGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45),  
 KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 21),  
 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46),  
 KKKIKVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 47),  
 5 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48),  
 KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 49),  
 KKKIYVSIDVKLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 50),  
 KKKIYVSIDVTLKQLESHKKK (SEQ ID NO: 51),  
 KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID NO: 52),  
 10 KKKIYVSIDVTLQQKESHKKK (SEQ ID NO: 53),  
 KKKIYVSIDVTLQQLKSHKKK (SEQ ID NO: 54),  
 KKKIYVSIDVTLQQLEKHKKK (SEQ ID NO: 55),  
 KKKIYVSIDVTLQQLESKKKK (SEQ ID NO: 56),  
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57),  
 15 KKKYVSIDVKLQQLEKKK (SEQ ID NO: 58),  
 KKKYVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID NO: 59),  
 KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60),  
 KKKYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID NO: 61).

3. Пептид за п. 2, який **відрізняється** тим, що пептид вибирають із групи, що складається з:

20 KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 22),  
 KKGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 24),  
 KKGYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID NO: 31),  
 KKGYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 32),  
 KKGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 33),  
 25 KKGYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 34),  
 KKGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 35),  
 KKGIYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 40),  
 KKGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 42),  
 KKGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45),  
 30 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46),  
 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48),  
 KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 49),  
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57),  
 KKKYVSIDVKLQQLEKKK (SEQ ID NO: 58),  
 35 KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60),  
 KKKYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID NO: 61).

4. Пептид за п. 3, який **відрізняється** тим, що пептид вибирають із групи, що складається з:

KKGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID NO: 24),  
 KKGYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 32),  
 40 KKGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 33),  
 KKGYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID NO: 34),  
 KKGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 35),  
 KKGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID NO: 42),  
 KKGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 45),  
 45 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46),  
 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48),  
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57),  
 KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60).

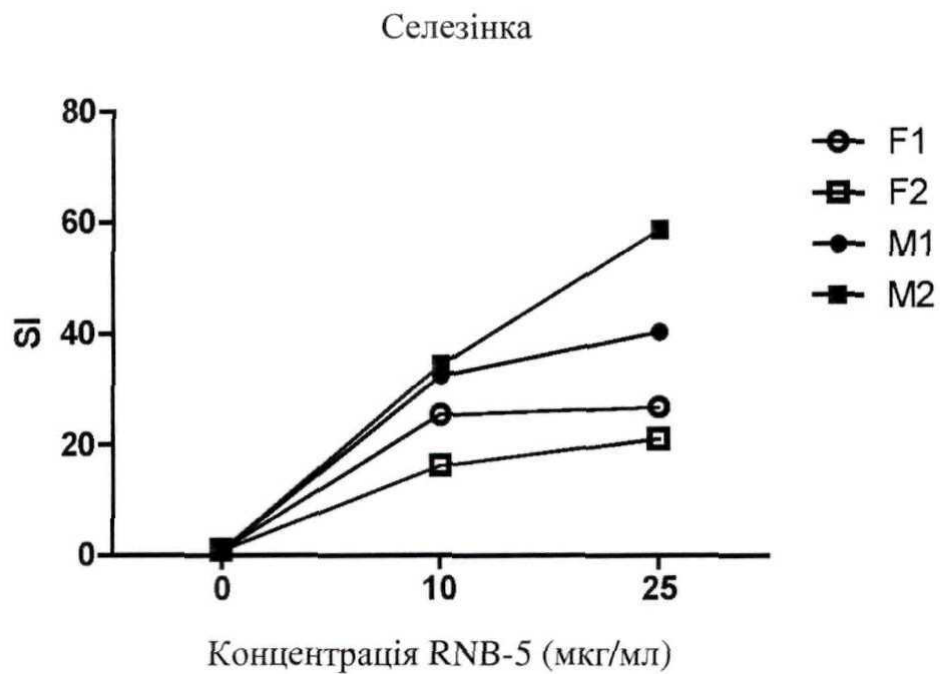
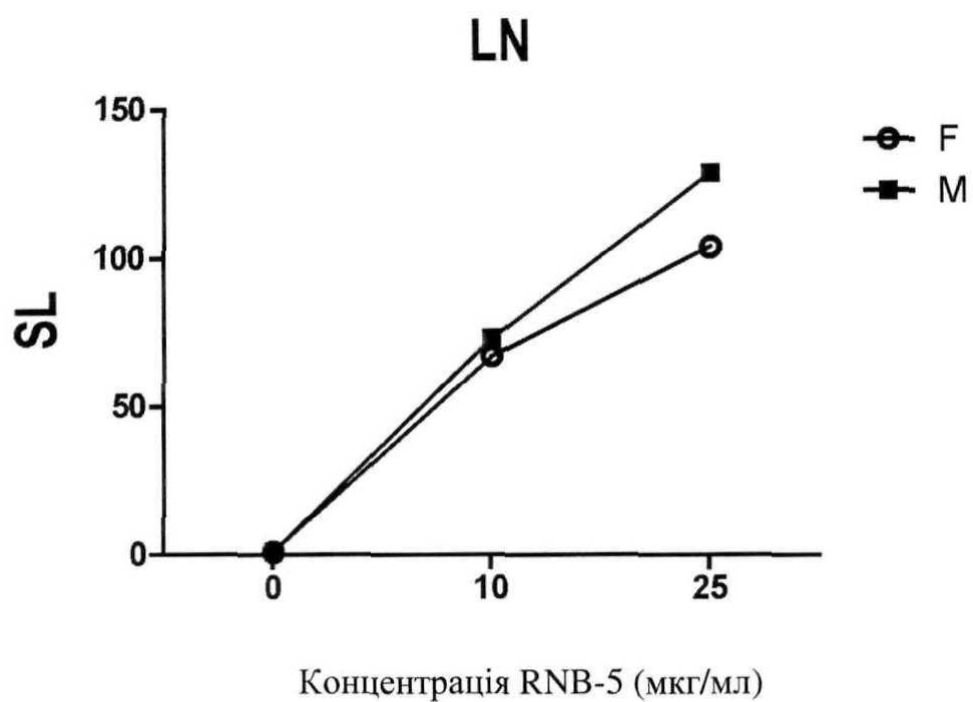
5. Пептид за п. 4, де зазначений пептид вибирають із групи, що складається з:

50 KKGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID NO: 32),  
 KKGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID NO: 34),  
 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 46),  
 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 48),  
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 57),  
 55 KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID NO: 60).

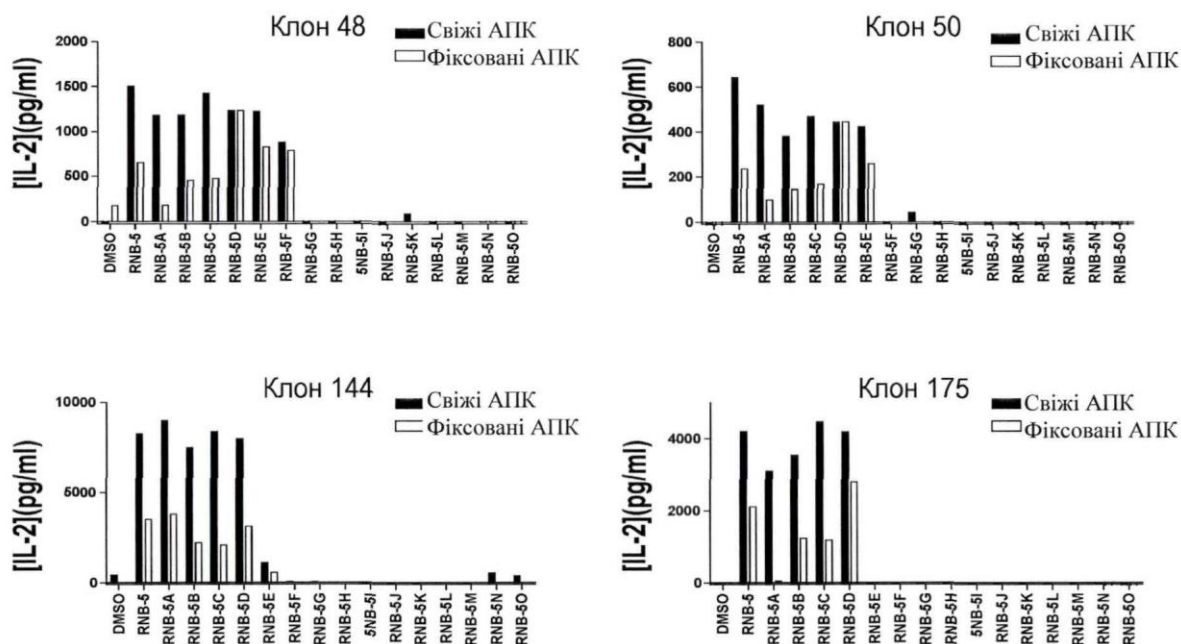
6. Композиція, яка включає множину пептидів, включаючи один або більше з пептидів за будь-яким із попередніх пунктів.

7. Пептид за будь-яким із пп. 1-5 для застосування в пригніченні або попередженні продукування ТТГР аутоімунних антитіл *in vivo*.

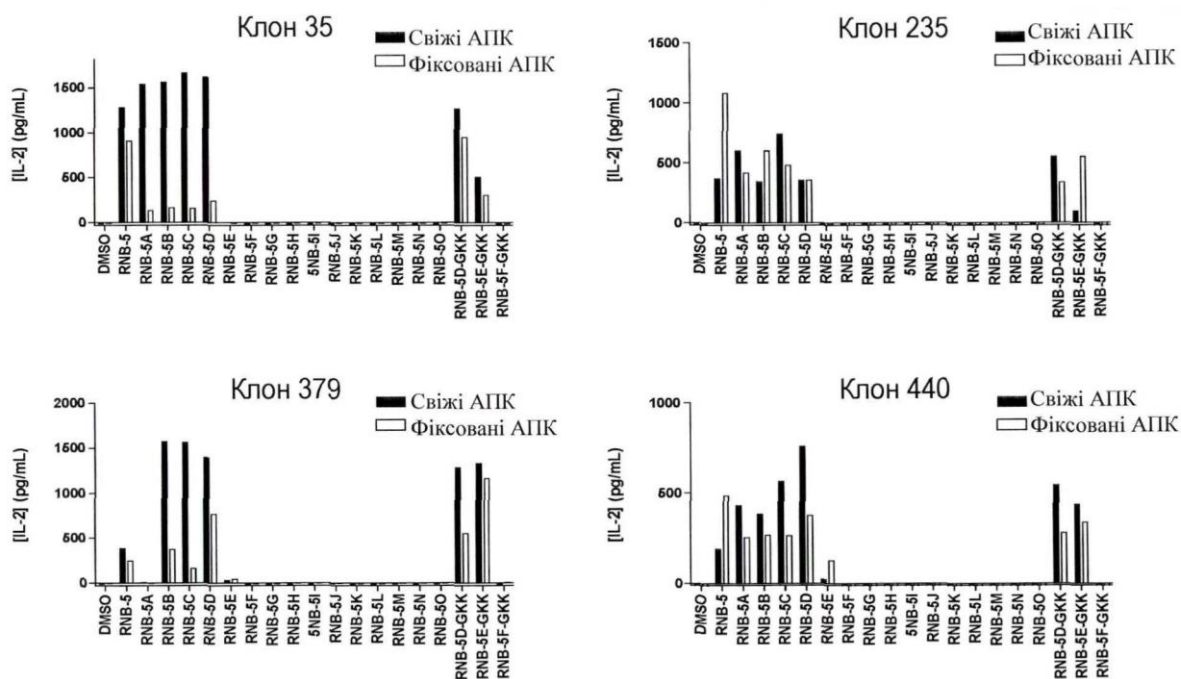
8. Пептид за будь-яким із пп. 1-5 для застосування в лікуванні і/або профілактиці хвороби Грейвса у суб'єкта.
9. Застосування пептиду за будь-яким із пп. 1-5 для виготовлення лікарського засобу для пригнічення або запобігання продукуванню ТТГР аутоімунних антитіл *in vivo*.
- 5 10. Застосування пептиду за будь-яким із пп. 1-5 для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або профілактики хвороби Грейвса.
11. Композиція за п. 6 для застосування в пригніченні або попередженні продукування ТТГР аутоімунних антитіл *in vivo*.
- 10 12. Композиція за п. 6 для застосування в лікуванні і/або профілактиці хвороби Грейвса у суб'єкта.
13. Застосування композиції за п. 6 для виготовлення лікарського засобу для пригнічення або попередження продукуванню ТТГР аутоімунних антитіл *in vivo*.
14. Застосування композиції за п. 6 для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або профілактики хвороби Грейвса.
- 15 15. Спосіб пригнічення або запобігання продукуванню ТТГР аутоімунних антитіл у суб'єкта, який включає стадію введення суб'єкту пептиду за будь-яким із пп. 1-5 або композиції за п. 6.
16. Спосіб лікування хвороби Грейвса у суб'єкта, який включає стадію введення суб'єкту пептиду за будь-яким із пп. 1-5 або композиції за п. 6.
17. Спосіб за будь-яким із пп. 15 або 16, де суб'єктом є HLA-DR3.
- 20 18. Спосіб за будь-яким із пп. 15 або 16, де суб'єктом є HLA-DR4.



**Фіг. 1**

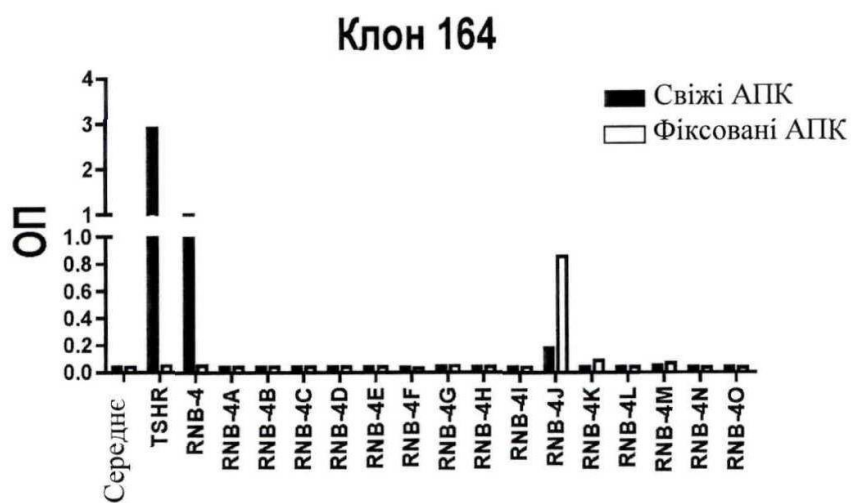


Фіг. 2

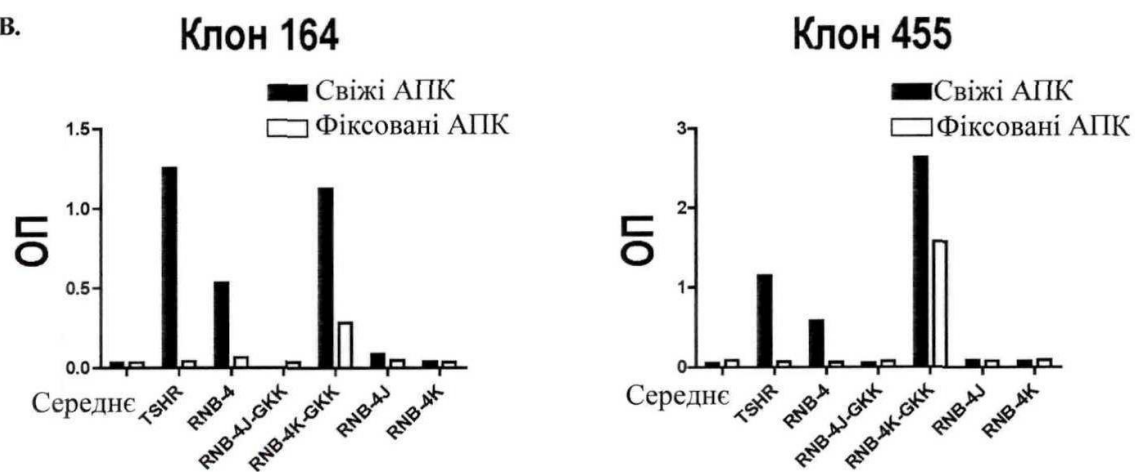


Фіг. 3

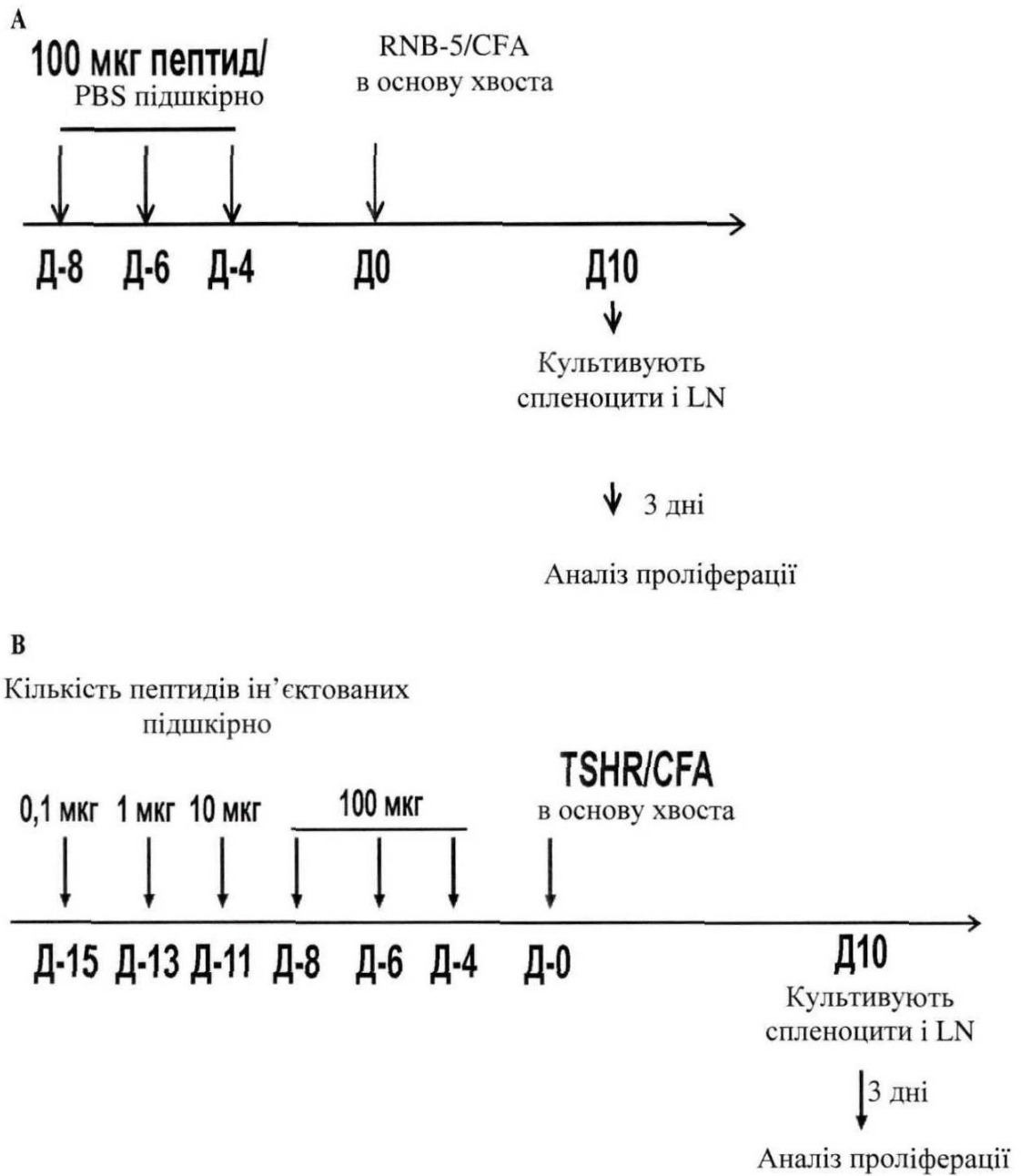
A.



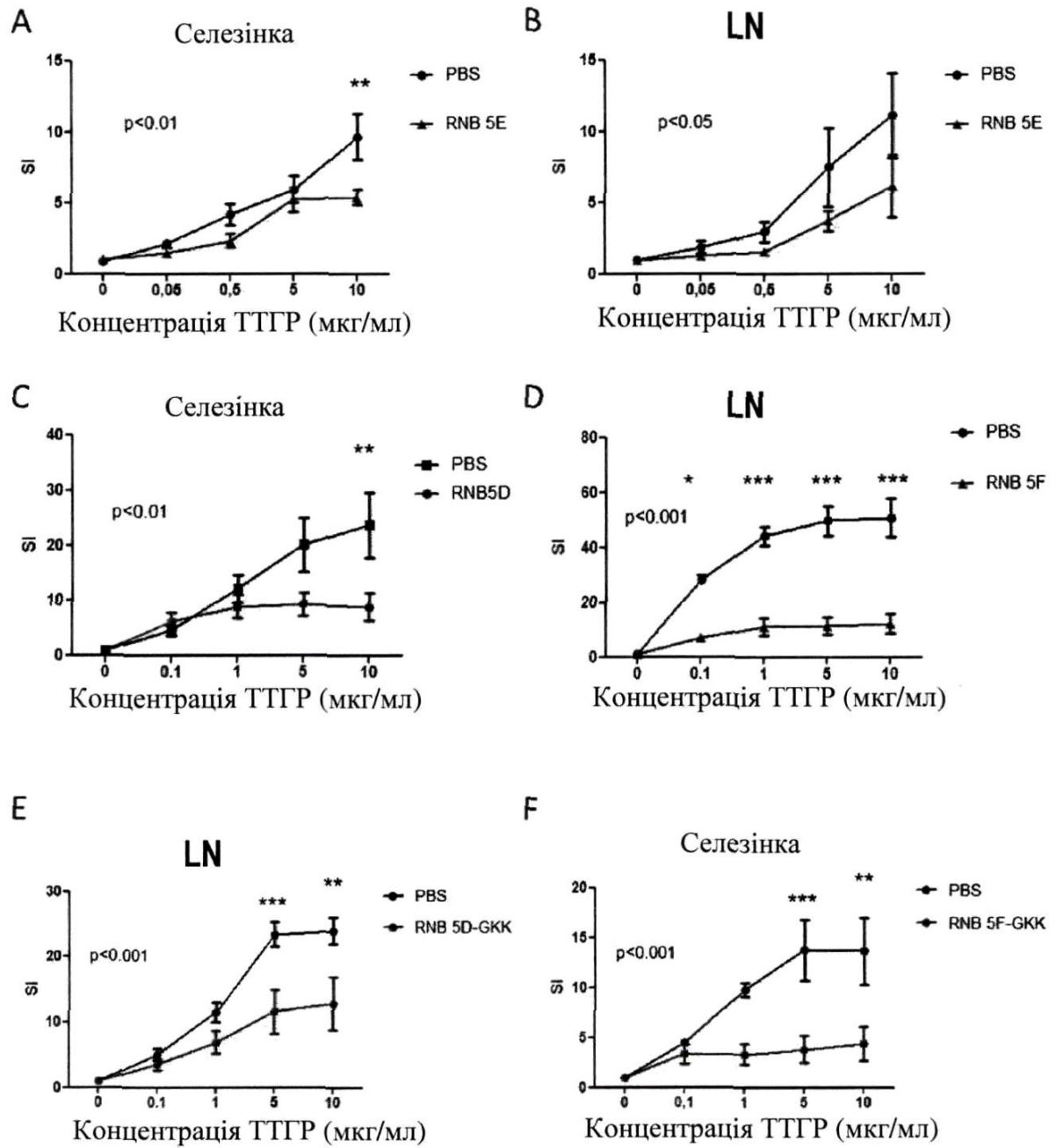
B.



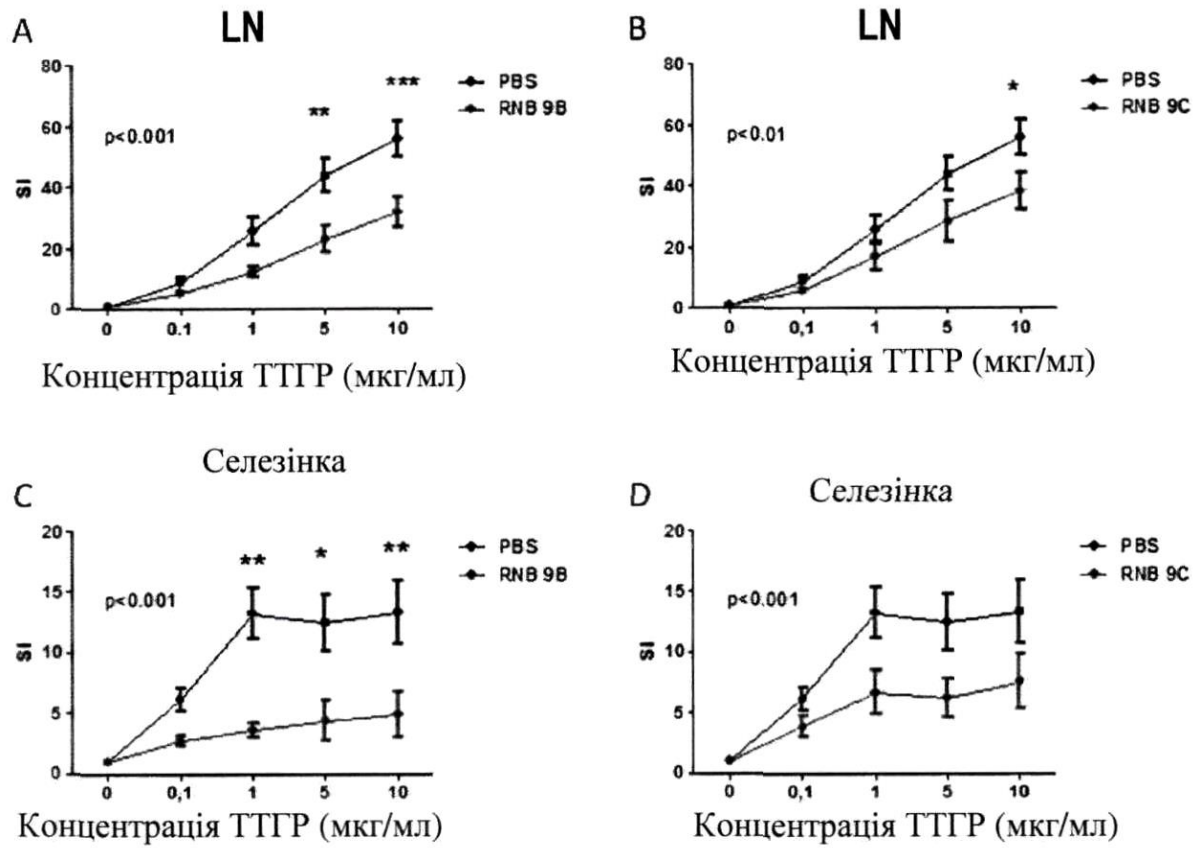
Фіг. 4



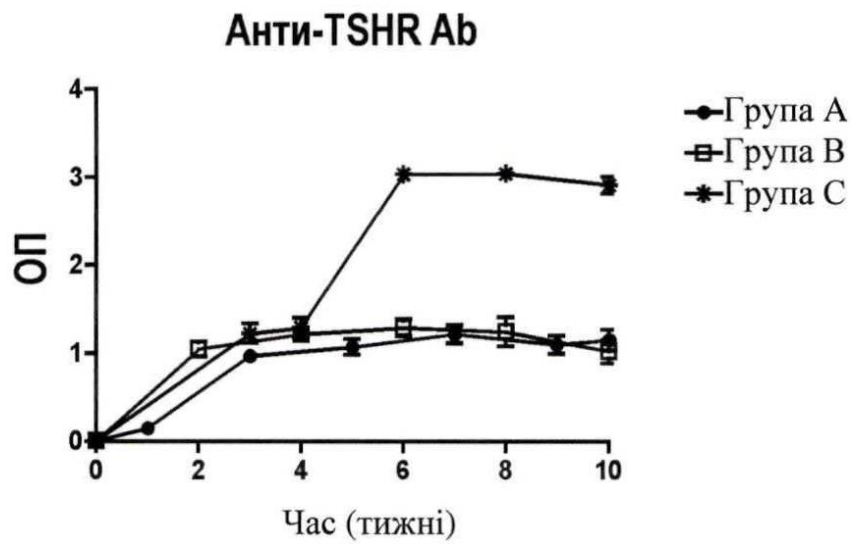
Фіг. 5



Фіг. 6

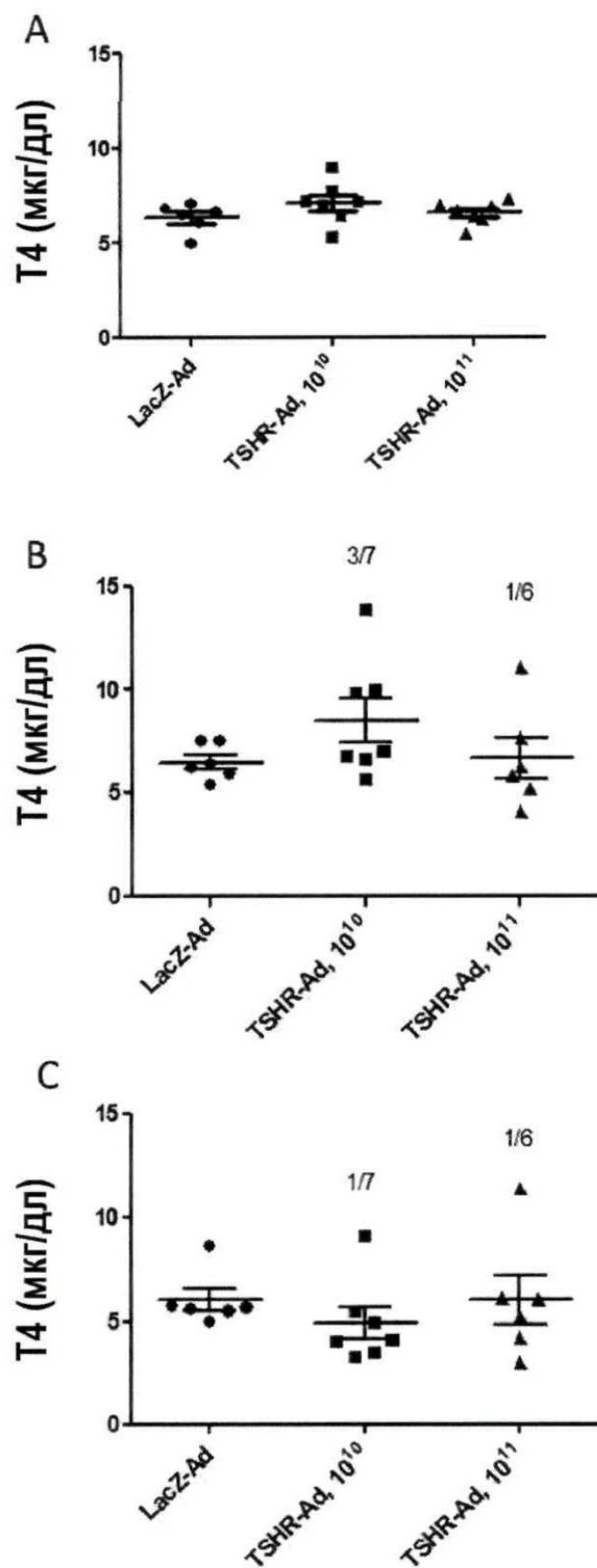


Фіг. 7



Фіг. 8





Фиг. 9

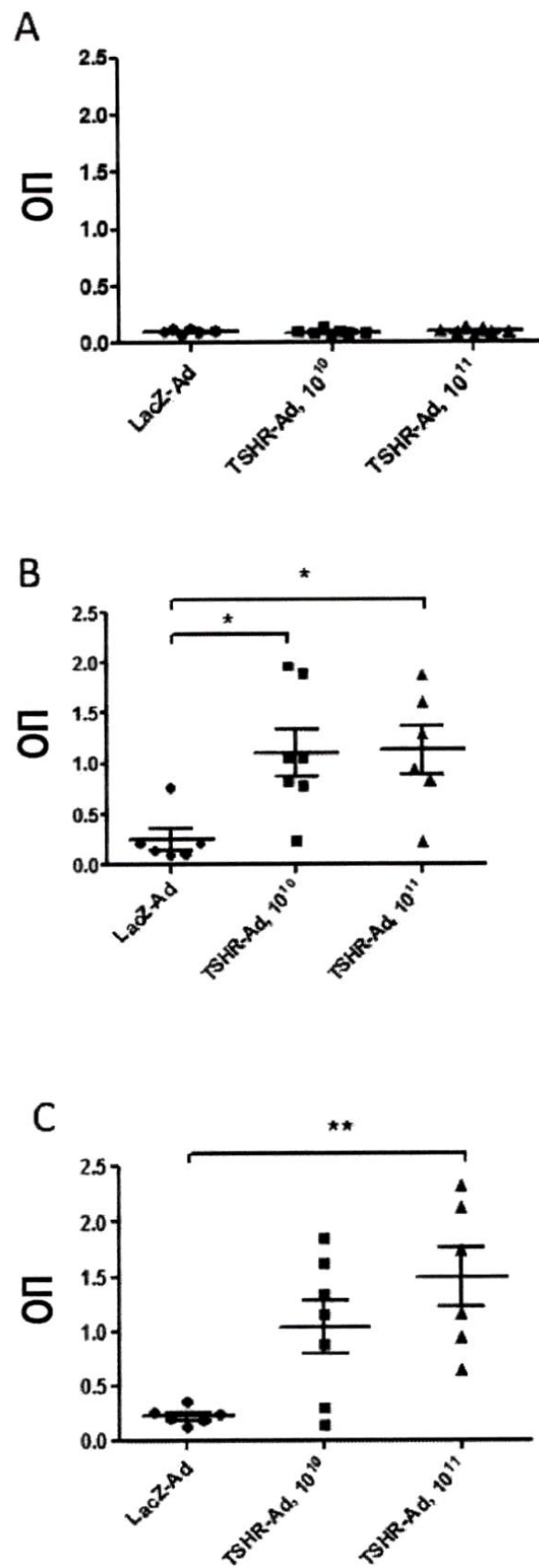
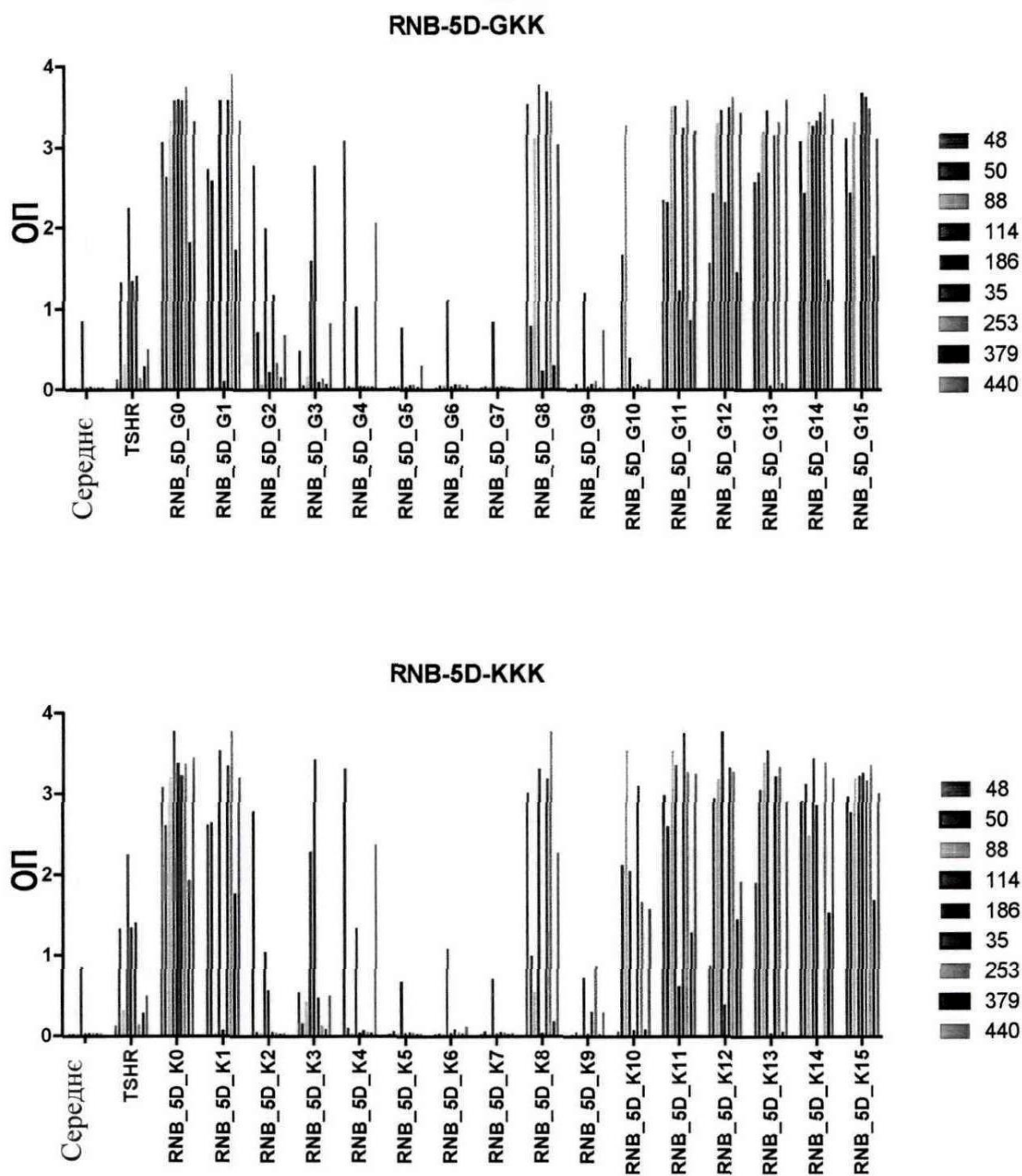
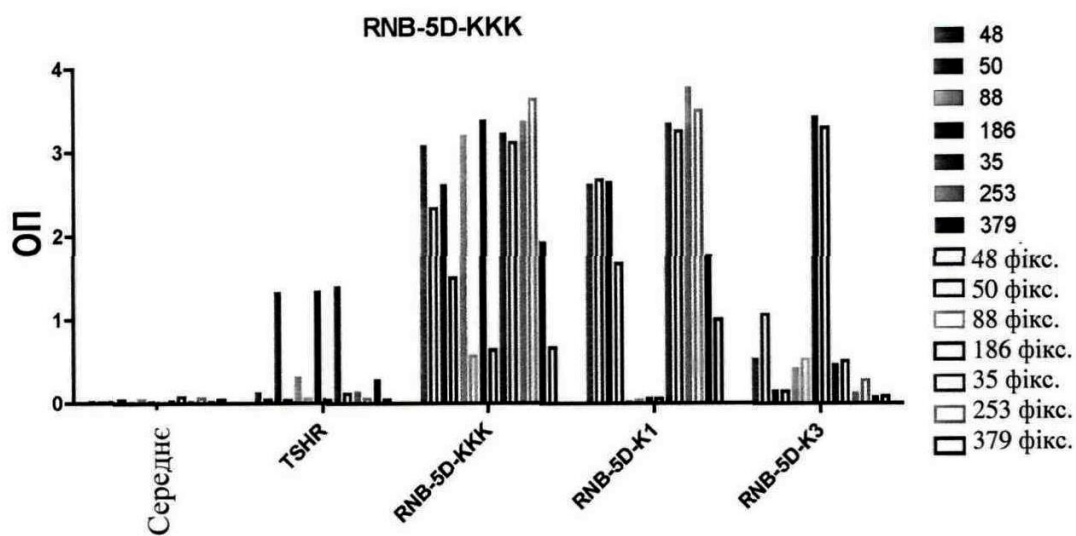
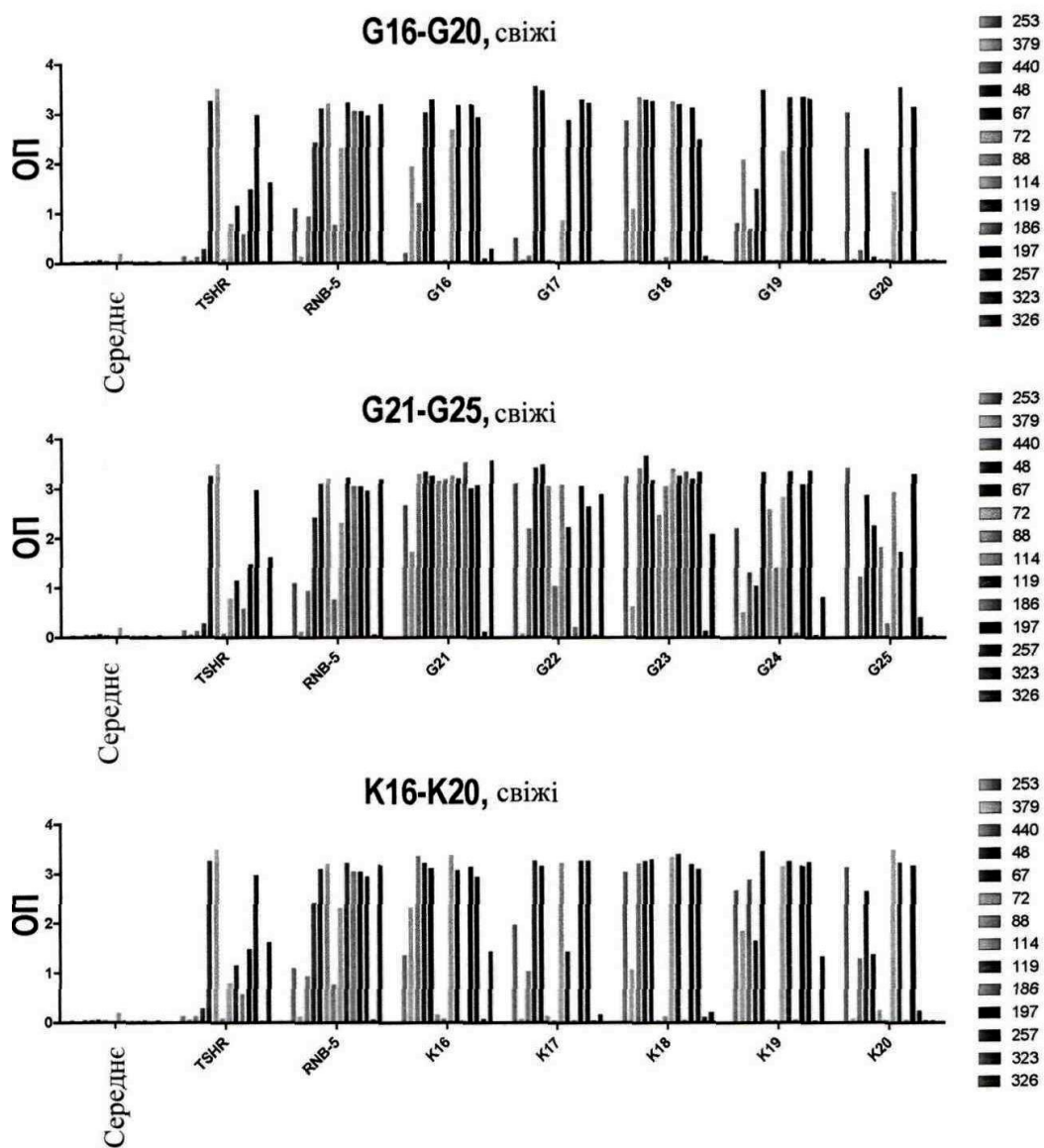


Fig. 10

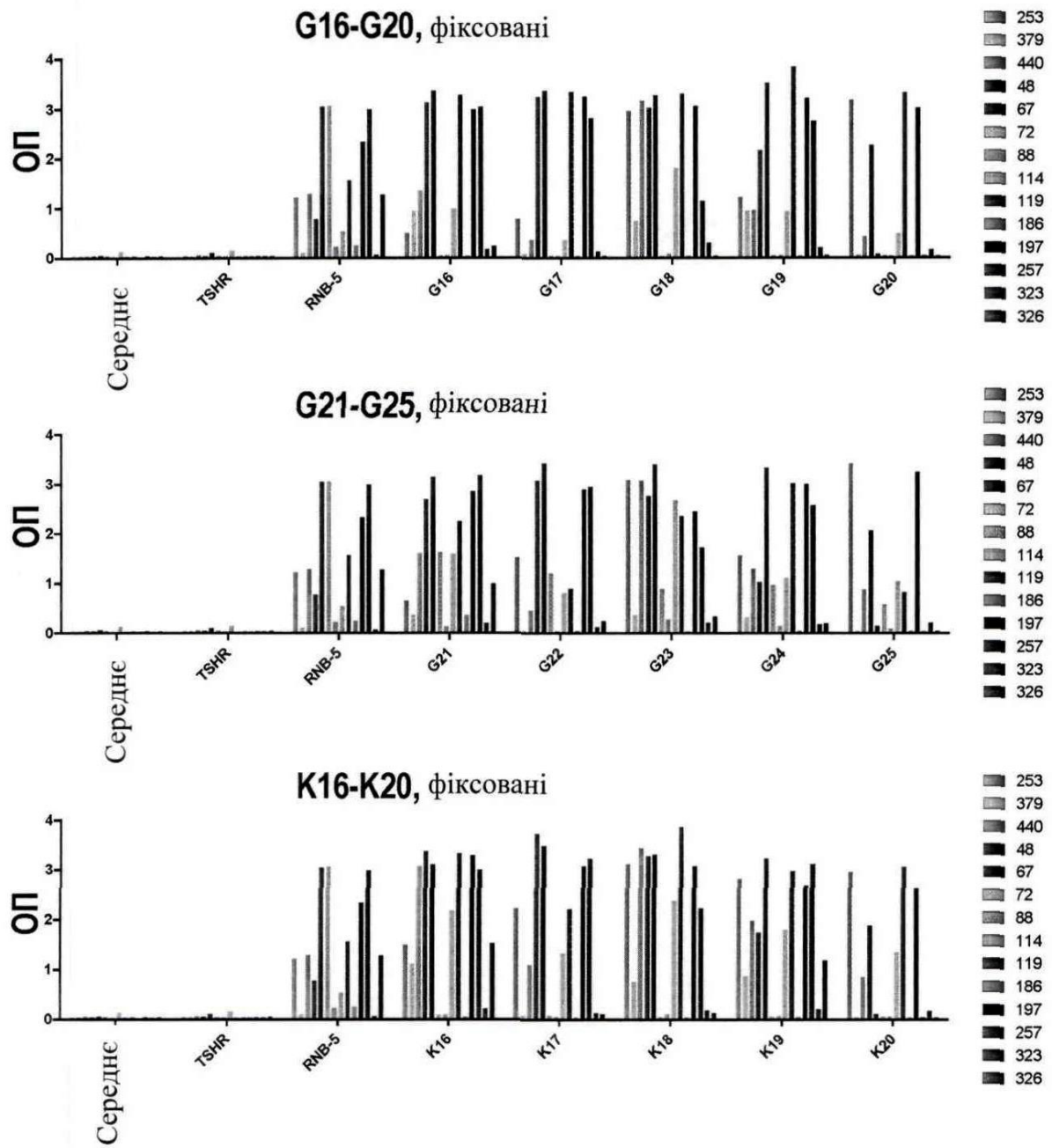




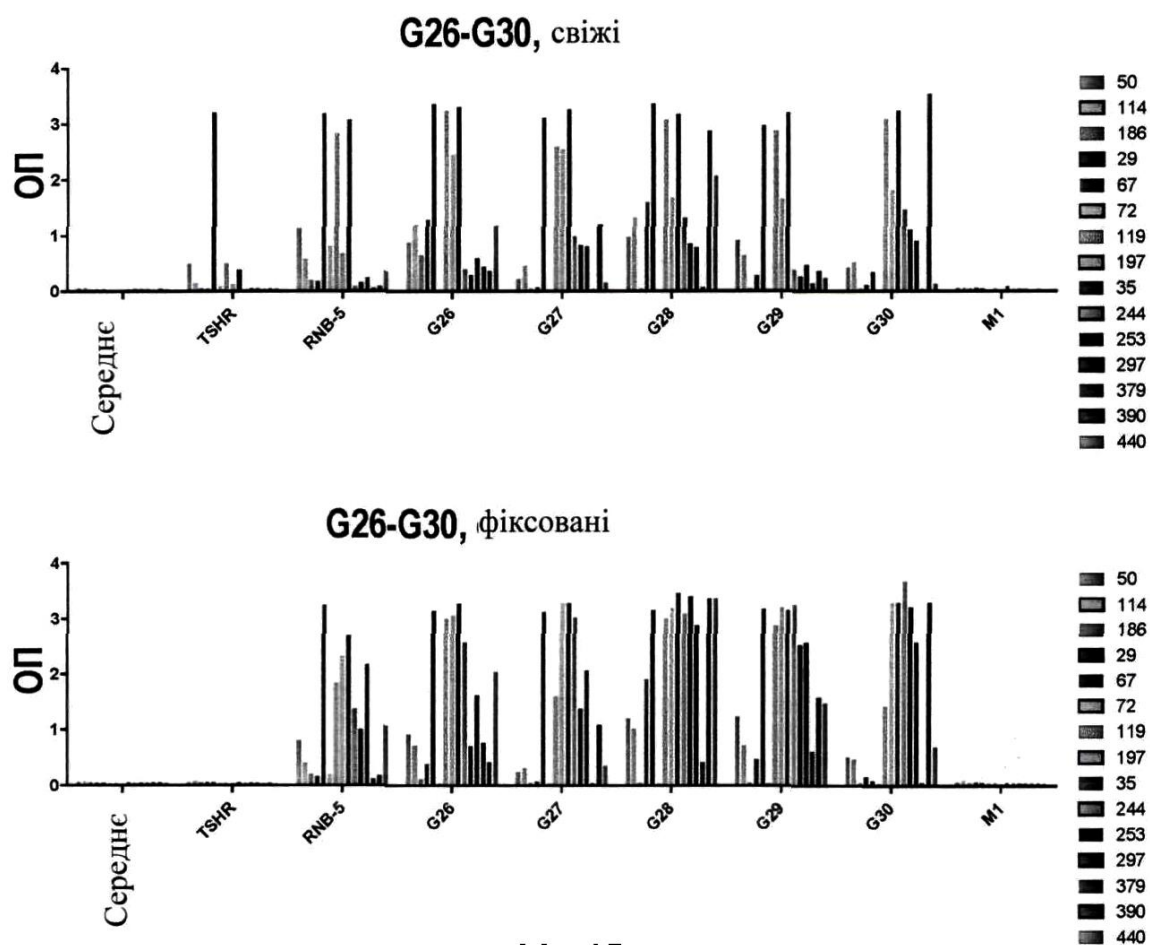
Фіг. 12



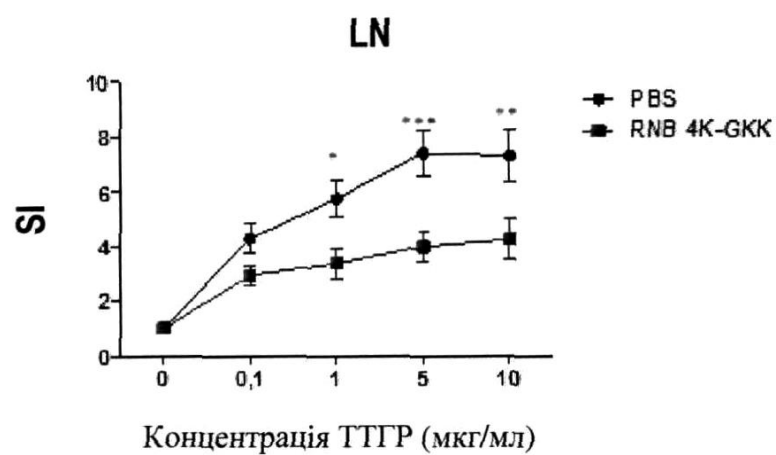
Фіг. 13



Фіг.14

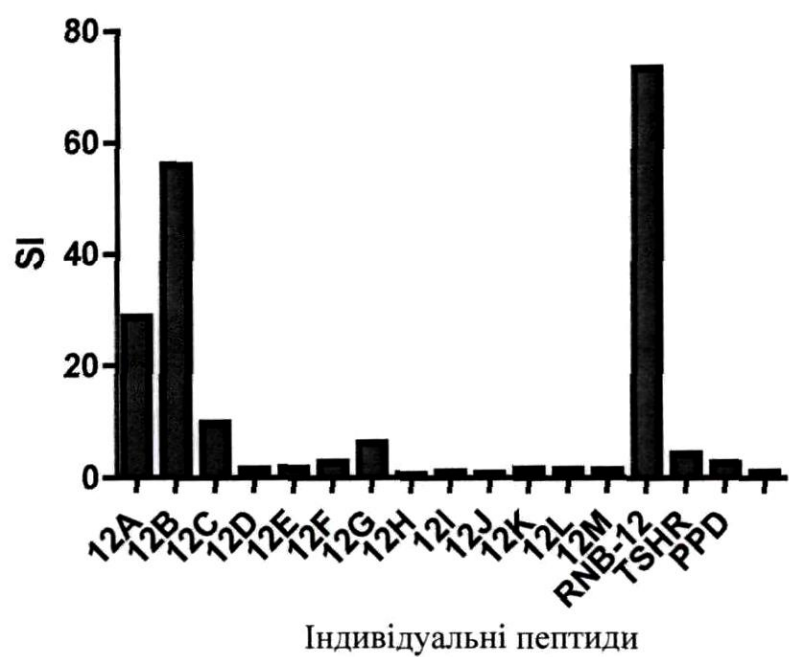


Фіг. 15

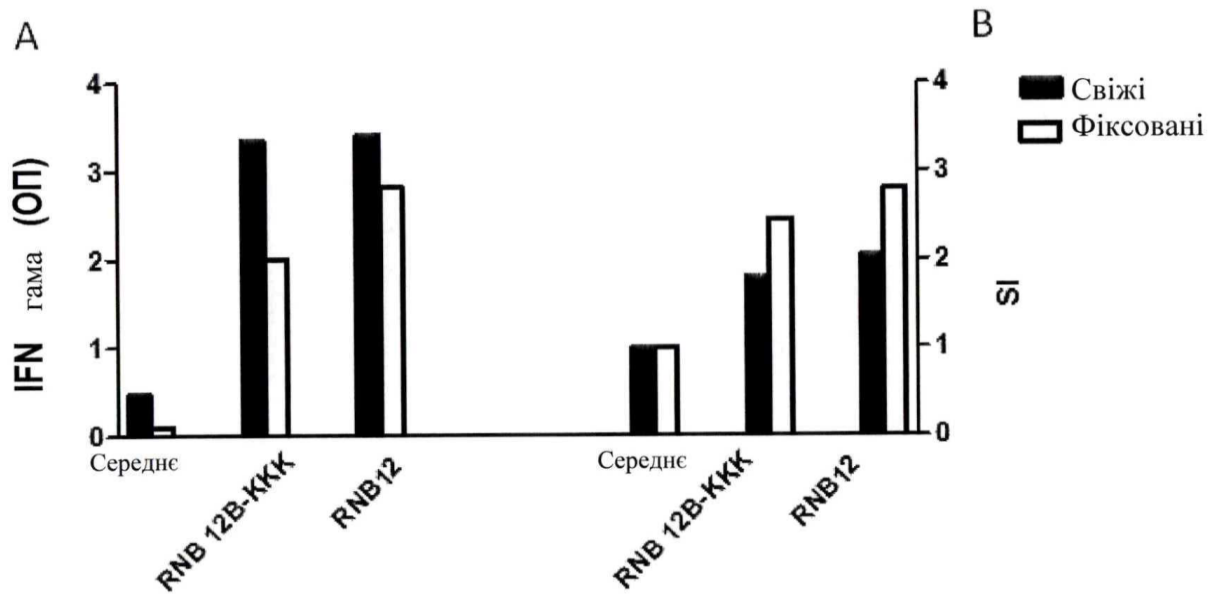


Фіг. 16

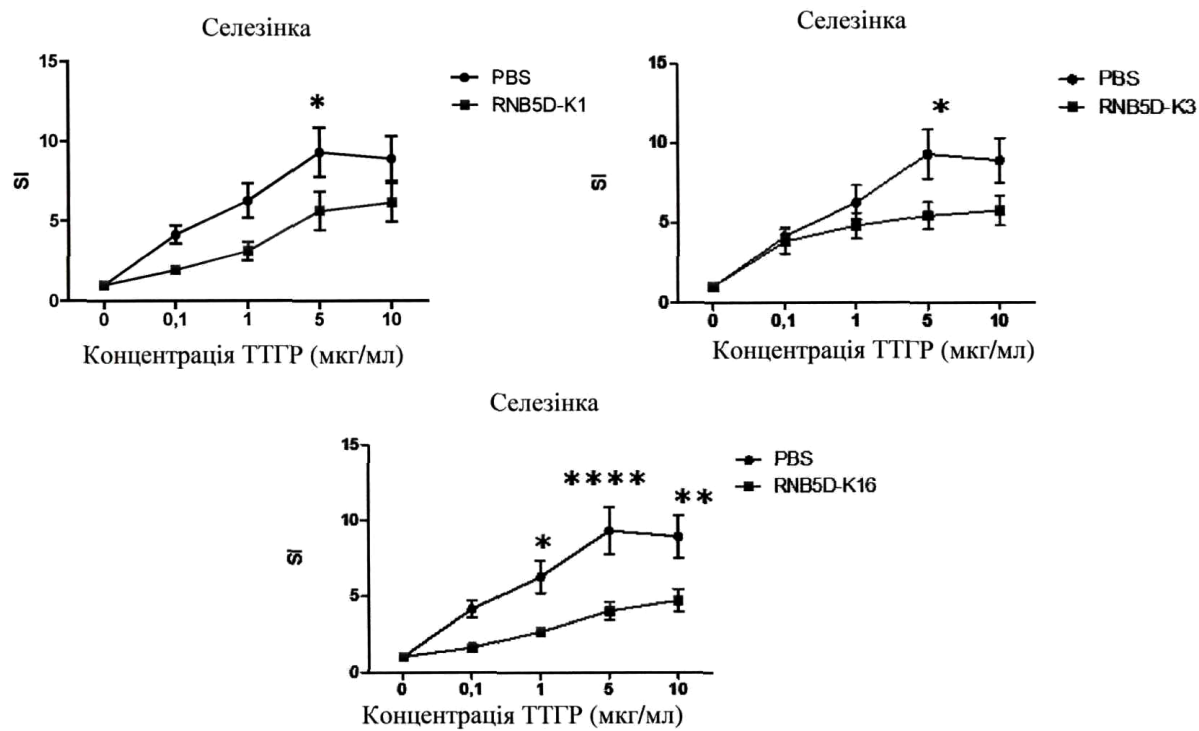
Т-клітинна лінія



Фіг. 17



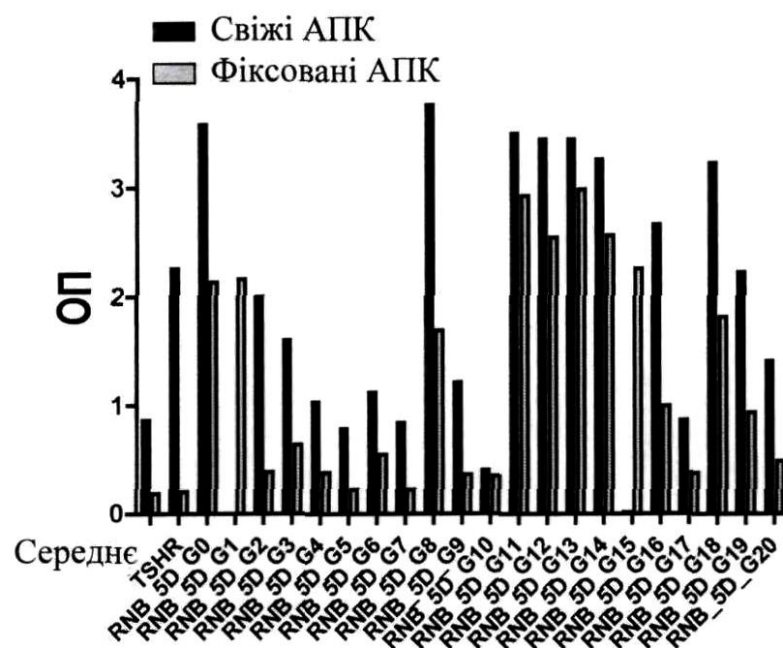
Фіг. 18



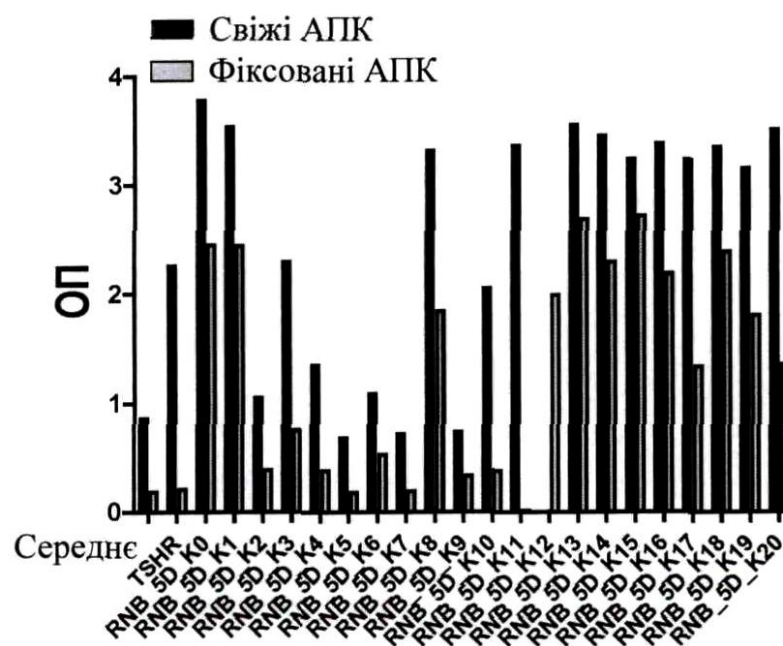
Фіг. 19



## Клон 114



## Клон 114



Фіг. 20

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601