

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191868** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.11.08

(51) Int. Cl. *C12N 15/06* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.01.03

(54) **ПЕПТИДНЫЕ БИБЛИОТЕКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/788,678; 62/791,601

(32) 2019.01.04; 2019.01.11

(33) US

(86) PCT/US2020/012236

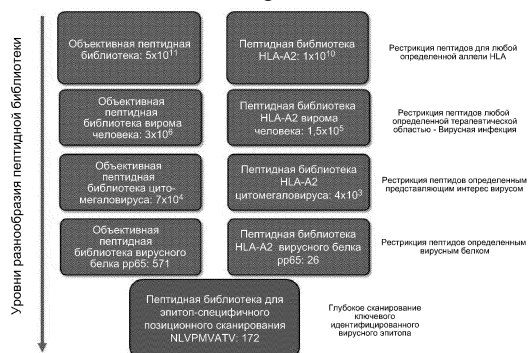
(87) WO 2020/142724 2020.07.09

(71) Заявитель:
**РЕПЕРТУАР ИММЬОН
МЕДИСИНС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Суэйн Джоанна Фелтхем, Афзелиус
Эллен Ловиса Ларсдоттер,
Гордон Уильям Майкл, Матранга
Кристиан Б., Ротем Ассаф, Ху Ган
(US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Парамонова К.В. (RU)**

(57) Описаны пептидные библиотеки и способы их применения.



202191868

A1

A1

202191868

ПЕПТИДНЫЕ БИБЛИОТЕКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] Данная заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США 62/788678, поданной 4 января 2019 года, и предварительной заявки на патент США 62/791601, поданной 11 января 2019, каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Существует ряд трудностей, связанных с получением и применением разнообразных пептидных библиотек.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПО ССЫЛКЕ

[0003] Все публикации, патенты, и заявки на изобретение, указанные в данном описании, приведены здесь в качестве ссылок в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, патент, или заявка на изобретение была явно и отдельным образом указана в как включенная в качестве ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение относится к композициям пептидных библиотек и способам применения данных пептидных библиотек.

[0005] В некоторых вариантах осуществления здесь описана пептидная библиотека, включающая совокупность пептидов, при этом совокупность пептидов включает более 1000, более 2000, более 5000, более 10000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов.

[0006] В некоторых вариантах осуществления здесь описан способ выделения пар лимфоцит-пептид, включающий: (a) контактирование совокупности лимфоцитов с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 1000 пептидов; и (b) получение совокупности компартментов, при этом компартмент совокупности включает (i) лимфоцит из совокупности лимфоцитов, связанный с пептидом из пептидной библиотеки, и (ii) носитель для захвата.

[0007] В некоторых вариантах осуществления здесь описан способ идентификации пары лимфоцит-пептид, включающий: (a) контактирование совокупности лимфоцитов с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 1000 пептидов; и (b) компартментализацию лимфоцита из совокупности лимфоцитов, связанного с пептидом из пептидной библиотеки, в отдельном компартменте, при этом пептид

включает уникальный пептидный идентификатор; и (с) определение уникального пептидного идентификатора для каждого пептида, связанного с компартиментализированным лимфоцитом.

[0008] В некоторых вариантах осуществления здесь описан способ применения объективной пептидной библиотеки, при этом способ включает контактирование образца с объективной пептидной библиотекой, включающей совокупность пептидов, при этом совокупность пептидов включает более 100, более 1000, более 2000, более 5000, более 10000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов.

[0009] В некоторых вариантах осуществления здесь описана композиция, включающая рМНС мультимер, присоединенный к уникальному идентификатору.

[0010] В некоторых вариантах осуществления здесь описан компартмент, включающий: (а) последовательность, кодирующую sc-рМНС; и (b) Т-клетку.

[0011] Для более полного понимания природы и преимуществ настоящего изобретения следует ознакомиться с приведенным далее подробным описанием наряду с прилагаемыми фигурами. Настоящее изобретение может быть модифицировано в плане различных аспектов без выхода за рамки настоящего изобретения. Соответственно, фигуры и описание приведенных ниже вариантов осуществления не являются ограничивающими.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0012] Патент или заявка содержит, по меньшей мере, одну фигуру, выполненную в цвете. Копии данного патента или публикации заявки на изобретение с цветной фигурой (фигурами) будут предоставлены Ведомством по запросу и при оплате соответствующей пошлины. Связанные с новизной признаки изобретения подробно указаны в прилагаемой формуле изобретения. Более полное понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения можно получить, обратившись к приведенному ниже подробному описанию, в котором описаны иллюстрирующие варианты осуществления, в рамках которых используются принципы изобретения, а также прилагаемым фигурам, из которых:

[0013] На **Фиг.1** показаны примеры вариантов осуществления пептидных библиотек с различным разнообразием.

[0014] На **Фиг.2А** показано ферментативное расщепление для повышения разнообразия пептидов. Пары дорожек 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 и 9-10 обозначают реакции синтеза белка без использования клеток (CFPS), осуществленные в рамках матрицы без расщепляемого фрагмента, матрицы с расщепляемым фрагментом без добавления протеазы, матрицы с

расщепляемым фрагментом с добавлением протеазы после завершения реакции, матрицы с расщепляемым фрагментом, в которой протеаза присутствовала во время реакции, и реакцию без матрицы, соответственно. Для определения общего выхода белка применяли вестерн-блоттинг.

[0015] На **Фиг.2В** показаны образцы в рамках CFPS реакции, которые содержали мультимерные и мономерные матрицы с/без расщепляемого фрагмента. Образцы подвергали блоттингу и осуществляли детектирование с использованием HRP антитела против FLAG.

[0016] На **Фиг.2С** показано, что пептиды, полученные с помощью CFPS и подвергнутые протеолитическому расщеплению, подвергались фолдингу с образованием узнаваемой 3-мерной структуры. CFPS белок тестировали на конформационное распознавание с помощью антитела. Данная фигура показывает, демонстрировал ли расщепленный протеазой пептид или нерасщепленный (содержащий fMet) пептид правильный фолдинг на основе распознавания антителом конформационного эпитопа.

[0017] На **Фиг.2D** показано связывание мультимера одноцепочечный пептид-MHC (sc-pMHC) с антиген-специфическими Т-клетками. Мультимеры получали с помощью CFPS и расщепления протеазой. Т-клетки инкубировали с мультимерами, затем окрашивали флуоресцентным антителом для детектирования и анализировали с помощью проточной цитометрии.

[0018] **Фиг.3** представляет собой результат блоттинга, показывающий пептиды, меченные одним или несколькими пептидными идентификаторами, на основе сдвига вверх полосы пептида.

[0019] На **Фиг.4** показаны результаты проточной цитометрии соответствующего связывания голого ЦМВ пептида, меченного пептидным идентификатором ЦМВ пептида, или отрицательного контроля для Т-клеток, являющихся или не являющихся специфическими в отношении ЦМВ.

[0020] На **Фиг.5** показаны результаты кПЦР соответствующего количества пептидного идентификатора, детектируемого после связывания пептида с Т-клетками. Значения количества подвергали нормализации относительно гена домашнего хозяйства.

[0021] На **Фиг.6** показано повышение содержания подвергнутых фолдингу пептидов в библиотеке по изобретению.

[0022] На **Фиг.7** показана проверка разнообразия библиотеки на основе секвенирования идентификаторов нуклеиновых кислот.

[0023] На **Фиг.8** показана идентификация пар пептид (антиген)-рецептор (TCR) на основе анализа полученных путем секвенирования данных, которые были получены с помощью композиций и способов по изобретению.

[0024] На **Фиг.9** показан анализ данных для пар пептид (антиген)-рецептор (TCR), полученных с помощью композиций и способов по изобретению. На **Фиг.9А** показана кластеризация на основе TCR для демонстрации профилей специфичности антигенов. На **Фиг.9В** показана кластеризация tSNE на основе антигенов для демонстрации конвергенции связывания TCR. На **Фиг.9С** показана конвергенция разнообразных TCR между субъектами.

[0025] На **Фиг.10** показано связывание sc-pMHC с TCR и влияние мутаций антигена на связывание.

[0026] На **Фиг.11** показан пример иммунофенотипирования на основе экспрессии генов представляющих интерес клеток, идентифицированных с помощью описанных здесь способов.

[0027] На **Фиг.12** показано специфичное и зависящее от дозировки связывание sc-pMHC с антиген-специфическими Т-клетками для примера антигена, идентифицированного с помощью описанных здесь способов.

[0028] На **Фиг.13** показана пролиферация и продуцирование цитокинов Т-клеток в ответ на родственный sc-pMHC для примера антигена, идентифицированного с помощью описанных здесь способов.

[0029] На **Фиг.14** показаны примеры размеров библиотек. На **Фиг.14А** показаны примеры размеров вирусных библиотек. На **Фиг.14В** показаны примеры размеров раковых библиотек.

[0030] На **Фиг.15** показан пример обзора получения пептидной библиотеки по настоящему изобретению (например в соответствии с примерами 21-25).

[0031] На **Фиг.16** приведена схема конструктора нуклеиновой кислоты, который может применяться в рамках композиций и способов по изобретению. Конструктор может кодировать пептид по изобретению (например sc-pMHC) и идентификатор (например самоидентификатор, который соответствует полной последовательности или части последовательности пептида). Указаны места расположения прямого и обратного праймеров (например праймеров, которые могут применяться в рамках примеров 21-23).

[0032] На **Фиг.17** показана ПЦР амплификация кодирующих полноразмерный антиген матриц (**Фиг.17А**) и идентификаторов (**Фиг.17В**) в гидрогели, как описано в примерах 22 и 23.

[0033] На **Фиг.18** показано получение подвергнутого фолдингу и меченного идентификатором sc-pMHC по изобретению. На **Фиг.18А** показаны микроскопные изображения, которые демонстрируют, что sc-pMHC по изобретению был *in vitro* транскрибирован и транслирован, как описано в примере 24. На **Фиг.18В** показаны результаты ELISA, которые демонстрируют высвобождение подвергнутых фолдингу sc-pMHC мультимеров, как описано в примере 25. На **Фиг.18С** показаны результаты вестерн-блота, которые демонстрируют, что sc-pMHC помечен идентификатором, как описано в примере 25.

[0034] На **Фиг.19** показаны результаты анализа на основе проточной цитометрии, которые демонстрируют, что sc-pMHC, полученный с помощью способов по изобретению, специфично связывается с родственными Т-клетками, как описано в примере 26.

[0035] На **Фиг.20** показаны результаты анализа на основе секвенирования отдельных клеток, которые демонстрируют, что sc-pMHC, полученный с помощью способов по изобретению, специфично связывается с родственными Т-клетками, как описано в примере 26.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0036] В соответствии с используемым здесь значением, термин "идентификатор" обозначает способное подвергаться чтению представление данных, которое передает информацию, такую как идентичность, соответствующую идентификатору.

[0037] В соответствии с используемым здесь значением, термин "мультимер" обозначает совокупность единиц. В некоторых вариантах осуществления мультимер включает одну или несколько различных единиц. В некоторых вариантах осуществления единицы в рамках мультимера являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления единицы в рамках мультимера являются различающимися. В некоторых вариантах осуществления мультимер включает смесь единиц, которые являются одинаковыми или различающимися.

[0038] В соответствии с используемым здесь значением, термин "пептидная библиотека" обозначает совокупность пептидов. В некоторых вариантах осуществления библиотека включает один или несколько пептидов с уникальными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления каждый пептид в библиотеке имеет различную последовательность. В некоторых вариантах осуществления библиотека включает смесь пептидов с одинаковыми или различающимися последовательностями.

[0039] В соответствии с используемым здесь значением, термин "объективный" обозначает отсутствие одного или нескольких критериев отбора.

[0040] В соответствии с используемым здесь значением, термин "носитель для захвата" обозначает поверхность для взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может представлять собой твердую поверхность. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать матрицу. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать наночастицу. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать шарик. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать магнитный шарик. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать гидрогель. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может представлять собой внутреннюю поверхность воды в капле масляной эмульсии. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать белок. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать антитело или его производное. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать гель. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать полимер. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может иметь заряд. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может быть флуоресцентным, например меченным флуоресцентным красителем или красителями.

Введение

[0041] В рамках данного изобретения предусмотрена пептидная библиотека. Пептидная библиотека может включать совокупность пептидов с различными аминокислотными последовательностями. Пептидные библиотеки могут применяться в рамках ряда скрининговых анализов для идентификации потенциальных диагностических или терапевтических мишеней или агентов. Пептидные библиотеки могут применяться, например, для скрининга специфических в плане заболевания, органа, или иных специфических в плане компартментов пептидов, для скрининга пептидов с терапевтическими вариантами использования, для скрининга пептидов с диагностическими вариантами использования, для скрининга нацеленных против опухолей пептидов, для скрининга эпитопов или антигенов антител, для скрининга Т-клеточных эпитопов или антигенов, для скрининга противомикробных пептидов, или для

любой их комбинации. Таким образом, разнообразные пептидные библиотеки подходящего качества имеют много ценных вариантов применения.

[0042] Пептидная библиотека может представлять собой библиотеку антигенов.

Неограничивающие примеры вариантов использования библиотек антигенов включают использование в рамках анализов, терапии и диагностики, связанных с иммунными антигенами. Например, библиотеки антигенов могут применяться в рамках скрининга для идентификации эпитопа белка, например эпитопа антитела или Т-клетки. Эпитопы антитела или Т-клетки могут сильно влиять на функционирование приобретенного иммунитета, поскольку они представляют собой определенные последовательности, которые распознают антитела, В-клеточные рецепторы (BCR), и Т-клеточные рецепторы (TCR). Эпитопами антител или эпитопами Т-клеток могут быть запущены многие эффекторные механизмы иммунной системы, таким образом библиотеки антигенов имеют потенциальные варианты использования, включая, но без ограничения, области, связанные с инфекционными заболеваниями, иммунотерапией рака и аутоиммунитетом. Эпитопы антител и Т-клеток могут быть адаптированы для широкого диапазона вариантов применения, включая, например, получение антител или антигенсвязывающих фрагментов для терапевтического или лабораторного использования, производство вакцин с помощью эпитопов антител или Т-клеток, и конструирование Т-клеток с известной антигенспецифичностью, например для иммунотерапии рака.

[0043] Существует ряд трудностей, связанных с получением и применением разнообразных пептидных библиотек. Огромное количество возможных пептидных последовательностей может вызывать трудности в плане получения библиотек. Для пептида длиной 9 остатков (9-мера) существует 20^9 (приблизительно $5,1 \times 10^{11}$) возможных комбинаций последовательностей 20 аминокислот, которые наиболее часто встречаются в белках. Потенциальные представляющие интерес источники антигенных пептидов (например патогены, раковые клетки, ткани) могут экспрессировать сотни или тысячи белков, при этом каждый белок включает совокупность потенциальных пептидных антигенов.

[0044] Был разработан ряд способов получения пептидов, однако многие из них имеют ограничения (например не обеспечивают достаточного покрытия всего разнообразия пептидов, имеют склонность к взаимодействиям с высокой аффинностью, применению условий для пептидов, которые приводят к образованию денатурированных или подвергнутых неправильным образом фолдингу белков, и так далее). В рамках данного изобретения предусмотрены пептидные библиотеки, включая, например, пептидные

библиотеки с высоким разнообразием, с полезными вариантами использования, как описано здесь. Также предусмотрены способы получения пептидных библиотек, включая, например, способы получения объективных пептидных библиотек.

Композиции пептидной библиотеки

[0045] В рамках данного изобретения предусмотрены пептидные библиотеки, включая, например, пептидные библиотеки с высоким разнообразием, которые могут применяться в рамках ряда терапевтических, диагностических и исследовательских вариантов использования. Данные предусмотренные пептидные библиотеки могут применяться, например, для скрининга специфических в плане заболевания, органа, или иных специфических в плане компартментов пептидов, для скрининга пептидов с терапевтическими вариантами использования, для скрининга пептидов с диагностическими вариантами использования, для скрининга нацеленных против опухолей пептидов, для скрининга эпитопов или антигенов антител, для скрининга Т-клеточных эпитопов или антигенов, для скрининга противомикробных пептидов, или для любой их комбинации.

[0046] Пептидная библиотека по изобретению может быть объективной или смещенной и может включать любое количество пептидов. Примеры вариантов осуществления пептидных библиотек с различным разнообразием показаны на **Фиг.1** и описаны ниже.

Объективная пептидная библиотека

[0047] Описанная здесь пептидная библиотека может представлять собой объективную библиотеку, например не имеющую одного или нескольких критериев отбора. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все возможные комбинации аминокислот для пептида определенного размера, то есть 20^k возможных k-мерных пептидов, включающих любую из 20 стандартных аминокислот, например 20^9 возможных 9-мерных пептидов, включающих любую из 20 стандартных аминокислот.

[0048] В некоторых вариантах осуществления библиотека включает пептиды, имеющие длину в виде диапазона, например от около 2 аминокислот (2-меры) до около 20 аминокислот (20-меры), или любого подходящего диапазона. В некоторых вариантах осуществления библиотека включает пептиды, имеющие по существу одинаковую длину, например 2-меры, 3-меры, 4-меры, 5-меры, 6-меры, 7-меры, 8-меры, 9-меры, 10-меры, 11-меры, 12-меры, 13-меры, 14-меры, 15-меры, 16-меры, 17-меры, 18-меры, 19-меры, 20-меры, или имеющие бóльшую длину.

[0049] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает ограниченные остатки в определенных положениях, например ограниченные остатки в положениях 2 и 9 для докинга с HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все возможные комбинации аминокислот в неограниченных остатках, например все 20^6 возможные 6-мерные последовательности в положениях 3, 4, 5, 6, 7 и 8 9-мерной последовательности с ограниченными остатками в положениях 1, 2 и 9. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все возможные комбинации аминокислот в пептиде определенного размера помимо ограниченных остатков, например все 20^7 возможных 9-мерных последовательностей, когда положения 2 и 9 являются ограниченными, а положения 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 варьируются.

[0050] Ограниченные остатки могут быть ограничены отдельным остатком или любым подмножеством остатков (например ограничены валином, лейцином или изолейцином). В некоторых вариантах осуществления ограниченные остатки могут представлять собой любой один подкласс аминокислот, например любую гидрофобную аминокислоту, любую гидрофильную аминокислоту, любую имеющую заряд аминокислоту, любую основную аминокислоту, любую кислую аминокислоту, любую циклическую аминокислоту, любую ароматическую аминокислоту, любую алифатическую аминокислоту, любую полярную аминокислоту, любую неполярную аминокислоту, или любую их комбинацию.

Варьирующиеся остатки могут быть выбраны из всех возможных остатков или могут быть выбраны из любого подмножества остатков. Например любой гидрофобной аминокислоты, любой гидрофильной аминокислоты, любой имеющей заряд аминокислоты, любой основной кислоты, любой кислой аминокислоты, любой циклической аминокислоты, любой ароматической аминокислоты, любой алифатической аминокислоты, любой полярной аминокислоты, любой неполярной аминокислоты, или любой их комбинации.

[0051] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены с помощью любых *in silico* способов получения. В некоторых вариантах осуществления библиотека может включать k-мерные пептиды из любого продукта трансляции, например эпитопа, антигена, белка или протеома. В некоторых вариантах осуществления библиотека включает k-мерные пептиды, полученные *in silico* из одного или нескольких геномов, экзомов, транскриптомов, протеомов, ORFомов (наборов открытых рамок считывания) или любых их комбинаций.

[0052] В некоторых вариантах осуществления библиотека включает все k-мерные пептиды, получаемые с помощью транскрипции и трансляции любой представляющей интерес полинуклеотидной последовательности, например с помощью *in silico* получения продуктов транскрипции и трансляции как прямых, так и обратных цепей генома или метагенома во всех шести рамках считывания. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* транскрипции и трансляции генома млекопитающего, например генома мыши, генома человека, генома пациента, генома пациента с аутоиммунитетом, или ракового генома. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* транскрипции и трансляции генома микроорганизма, например бактериального генома, вирусного генома, генома простейших, генома проститов, генома дрожжей, генома архей, или генома бактериофагов. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* транскрипции и трансляции генома патогена, например генома бактериального патогена, генома вирусного патогена, генома грибкового патогена, генома оппортунистического патогена, генома условного патогена, или генома эукариотического паразита. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению может быть получена из генома растения или генома грибка. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает k-мерные пептиды, полученные на основе *in silico* транскрипции и трансляции генома, при этом геном подвергается модификации при *in silico* транскрипции и трансляции, например подвергается мутированию *in silico* для получения k-мерных пептидов, включающих мутации (например замещения, вставки, удаления).

[0053] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* трансляции представляющего интерес экзона, например экзона млекопитающего, экзона человека, экзона мыши, экзона пациента, экзона пациента с аутоиммунитетом, ракового экзона, вирусного экзона, экзона простейших, экзона протистов, экзона дрожжей, экзона патогена, экзона эукариотического патогена, экзона растения или экзона грибка. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает k-мерные пептиды, полученные на основе *in silico* трансляции экзона, при этом экзон подвергается модификации при *in silico* трансляции, например подвергается мутированию *in silico* для

получения k-мерных пептидов, включающих мутации (например замещения, вставки, удаления).

[0054] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* трансляции представляющего интерес транскриптома, например транскриптома млекопитающего, транскриптома человека, транскриптома мыши, транскриптома пациента, транскриптома пациента с аутоиммунитетом, ракового транскриптома, транскриптома микроорганизма, бактериального транскриптома, вирусного транскриптома, транскриптома простейших, транскриптома проститов, транскриптома дрожжей, транскриптома архей, транскриптома бактериофагов, транскриптома патогена, транскриптома эукариотического паразита, транскриптома растения, транскриптома грибка, полученного на основе секвенирования РНК транскриптома, микробиомного транскриптома, или транскриптома, полученного на основе метагеномного секвенирования РНК. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает k-мерные пептиды, полученные на основе *in silico* трансляции транскриптома, при этом транскриптом подвергается модификации при *in silico* трансляции, например подвергается мутированию *in silico* для получения k-мерных пептидов, включающих мутации (например замещения, вставки, удаления).

[0055] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе представляющего интерес протеома, например протеома млекопитающего, протеома человека, протеома мыши, протеома пациента, протеома пациента с аутоиммунитетом, ракового протеома, протеома микроорганизма, бактериального протеома, вирусного протеома, протеома простейших, протеома проститов, протеома дрожжей, протеома архей, протеома бактериофагов, протеома патогена, протеома эукариотического паразита, протеома растения или протеома грибка. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает k-мерные пептиды, полученные на основе протеома, при этом k-мерные пептиды модифицированы по сравнению с последовательностью протеома, например k-мерные пептиды, включающие мутации (например замещения, вставки, удаления).

[0056] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* трансляции представляющего интерес ORFома (набора открытых рамок считывания), например ORFома млекопитающего, ORFома человека, ORFома мыши, ORFома пациента, ORFома пациента с аутоиммунитетом, ракового ORFома, ORFома микроорганизма, бактериального ORFома, вирусного ORFома, ORFома простейших, ORFома проститов,

ORFома дрожжей, ORFома архей, ORFома бактериофагов, ORFома патогена, ORFома эукариотического паразита, ORFома растения или ORFома грибка, полученного на основе секвенирования следующего поколения ORFома, микробиомного ORFома, или ORFома, полученного на основе метагеномного секвенирования. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает k-мерные пептиды, полученные на основе *in silico* трансляции ORFома, при этом ORFом подвергается модификации при *in silico* трансляции, например подвергается мутированию *in silico* для получения k-мерных пептидов, включающих мутации (например замещения, вставки, удаления).

[0057] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, полученные на основе *in silico* транскрипции и трансляции или трансляции группы геномов, протеомов, транскриптомов, ORFомов, или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* транскрипции и трансляции или трансляции полинуклеотидных последовательностей из группы образцов, например клинических образцов группы пациентов или группы геномов патогенов. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* транскрипции и трансляции группы вирусных геномов, например вирома человека. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе *in silico* транскрипции и трансляции группы геномов, протеомов, транскриптомов, ORFомов, или любой их комбинации, при этом исходные последовательности подвергаются модификации при *in silico* трансляции, например подвергаются мутированию *in silico* для получения k-мерных пептидов, включающих мутации (например замещения, вставки, удаления).

[0058] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе различающихся генома, протеома, транскриптома, ORFома, или любой их комбинации, при этом два или более генома, протеома, транскриптома, ORFома или их комбинация сравниваются для идентификации последовательностей, которые представляют собой различающиеся последовательности (например, которые различаются между ними), например различаются в плане нуклеотидной последовательности, аминокислотной последовательности, встречаемости нуклеотидов или встречаемости белков. В некоторых вариантах осуществления различающиеся последовательности генома, протеома, транскриптома или ORFома получают путем сравнения представляющих интерес тканей.

В некоторых вариантах осуществления различающиеся последовательности генома, протеома, транскриптома или ORFома получают путем сравнения последовательностей из представляющих интерес клеток (например здоровой клетки и раковой клетки). В некоторых вариантах осуществления различающиеся последовательности генома, протеома, транскриптома или ORFома получают путем сравнения последовательностей представляющих интерес организмов. В некоторых вариантах осуществления различающиеся последовательности генома, протеома, транскриптома или ORFома могут быть получены путем сравнения представляющих интерес субъектов (например имеющих заболевание и здоровых субъектов). В некоторых вариантах осуществления различающиеся последовательности различаются, по меньшей мере, на 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, или 1%. В некоторых вариантах осуществления различающиеся последовательности различаются на от 1% до 100%, от 5% до 100%, от 10% до 100%, от 15% до 100%, от 20% до 100%, от 25% до 100%, от 30% до 100%, от 40% до 100%, от 50% до 100%, от 60% до 100%, от 70% до 100%, от 80% до 100%, от 90% до 100%, от 95% до 100%, от 30% до 90%, от 40% до 90%, от 50% до 90%, от 60% до 90%, от 70% до 90%, от 80% до 90%, или от 60% до 80%. В некоторых вариантах осуществления различающиеся последовательности имеют, по меньшей мере, 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, или 1% различие между сравниваемыми последовательностями. В некоторых вариантах осуществления различающиеся последовательности имеют от 1% до 100%, от 5% до 100%, от 10% до 100%, от 15% до 100%, от 20% до 100%, от 25% до 100%, от 30% до 100%, от 40% до 100%, от 50% до 100%, от 60% до 100%, от 70% до 100%, от 80% до 100%, от 90% до 100%, от 95% до 100%, от 30% до 90%, от 40% до 90%, от 50% до 90%, от 60% до 90%, от 70% до 90%, от 80% до 90%, или от 60% до 80% различие между сравниваемыми последовательностями.

[0059] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе гомологичных последовательностей геномов, протеомов, транскриптомов, ORFомов, или любой их комбинации, при этом два или более генома, протеома, транскриптома, ORFома или их комбинация сравниваются для идентификации последовательностей, которые представляют собой гомологичные последовательности (например, которые имеют определенную степень гомологии), например гомологичных нуклеотидных

последовательностей, гомологичных аминокислотных последовательностей, встречаемости гомологичных нуклеотидов или встречаемости гомологичных белков. В некоторых вариантах осуществления гомологичные последовательности геномов, протеомов, транскриптомов или ORFомов получают путем сравнения представляющих интерес тканей. В некоторых вариантах осуществления гомологичные последовательности геномов, протеомов, транскриптомов или ORFомов получают путем сравнения последовательностей из представляющих интерес клеток (например здоровой клетки и связанной с аутоиммунитетом клетки (например, клетки, которая индуцирует аутоиммунитет, или клетки, которая является мишенью при аутоиммунитете)). В некоторых вариантах осуществления гомологичные последовательности геномов, протеомов, транскриптомов или ORFомов получают путем сравнения последовательностей из представляющих интерес организмов. В некоторых вариантах осуществления гомологичные последовательности геномов, протеомов, транскриптомов или ORFомов получают путем сравнения представляющих интерес субъектов (например имеющих заболевание и здоровых субъектов). В некоторых вариантах осуществления гомологичные последовательности имеют гомологию, по меньшей мере, 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, или 1%. В некоторых вариантах осуществления гомологичные последовательности имеют гомологию от 1% до 100%, от 5% до 100%, от 10% до 100%, от 15% до 100%, от 20% до 100%, от 25% до 100%, от 30% до 100%, от 40% до 100%, от 50% до 100%, от 60% до 100%, от 70% до 100%, от 80% до 100%, от 90% до 100%, от 95% до 100%, от 30% до 90%, от 40% до 90%, от 50% до 90%, от 60% до 90%, от 70% до 90%, от 80% до 90% или от 60% до 80%.

[0060] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, кодирующие представляющую интерес последовательность с определенной степенью гомологии (например различающуюся последовательность или гомологичную последовательность, идентифицированную как описано выше). В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает наиболее близкие гомологи между двумя или более представляющими интерес последовательностями.

[0061] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе представляющей интерес пептидной последовательности, например все возможные 9-мерные пептиды,

соответствующее полной белковой последовательности вирусного белка. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе представляющей интерес полипептидной последовательности, при этом представляющая интерес полипептидная последовательность является модифицированной, например подвергнутой мутированию *in silico* для получения k-мерных пептидов, включающих мутации (например замещения, вставки, удаления).

[0062] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе мутаций в представляющей интерес последовательности, например все 9-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе мутаций одного нуклеотида в полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген или эпитоп. Например, библиотека по изобретению включает все 9-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или девяти нуклеотидных мутаций в полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген или эпитоп. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе замещений аланином, например замещений аланином в любом положении в любой из описанных здесь последовательностей (например белок, группу белков, протеом, *in silico* транскрибированный и транслированный геном). В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает библиотеку для позиционного сканирования, где выбранные аминокислотные остатки последовательно замещаются всеми другими встречающимися в природе аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает библиотеку для комбинаторного позиционного сканирования, где выбранные аминокислотные остатки последовательно замещаются всеми другими встречающимися в природе аминокислотами в двух или более положениях за один раз. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает перекрывающуюся пептидную библиотеку, включающую перекрывающиеся пептиды из последовательности матрицы (например *in silico* транслированного генома), где перекрывающиеся пептиды установленной длины сдвигаются на определенное количество остатков. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает библиотеку усеченных пептидов Т-клеток, где каждый репликат библиотеки включает эквимоллярные смеси пептидов с усечениями на одном конце (например 8-меры, 9-меры, 10-меры и 11-меры, которые могут быть получены на основе усечений по С-концу номинального 11-мера). В некоторых вариантах

осуществления библиотека по изобретению включает модифицированный набор пептидов, при этом модифицированный набор пептидов представлен в виде перечня.

[0063] В некоторых вариантах осуществления геном, экзом, транскриптом, протеом, или ORFом (набор открытых рамок считывания) по изобретению представляет собой вирусный геном, экзом, транскриптом, протеом, или ORFом. Неограничивающие примеры вирусов включают аденовирус, аденоассоциированный вирус, штамм вируса гриппа Aichi, лиссавирус австралийских летучих мышей, полиомавирус ВК, вирус Банна, вирус леса Барма, вирус Буньямвера, вирус Буньямвера Ла Кросс, вирус Буньямвера зайца беляка, церкопитециновый вирус герпеса, вирус чандипуры, вирус чикунгунья, косавирус А, вирус коровьей оспы, вирус Коксаки, вирус конго-крымской геморрагической лихорадки, цитомегаловирус (ЦМВ), вирус денге, вирус Дори, вирус Дугбе, вирус Дювенхаге, вирус восточного конского энцефалита, эболавирус, эховирус, вирус энцефаломиокардита, вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ), европейский лиссавирус летучих мышей, GB-вирус С / вирус гепатита G, вирус Хантаан, вирус Хендры, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита Е, вирус гепатита дельта, вирус оспы лошадей, аденовирус человека, астровирус человека, коронавирусы человека, цитомегаловирус человека, эндогенный ретровирус человека (HERV), энтеровирус человека, вирус герпеса человека (например HHV-1, HHV-2, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, HHV-8, вирус иммунодефицита человека (например ВИЧ-1, ВИЧ-2), Вирус папилломы человека (например ВПЧ-1, ВПЧ-2, ВПЧ-16, ВПЧ-18, парагрипп человека, парвовирус человека B19, респираторно-синцитиальный вирус человека (RSV), риновирус человека, коронавирусы SARS человека, спумаретровирус человека, Т-лимфотропный вирус человека (HTLV, например HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3), торовирус человека, вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, исфаханский вирус, полиомавирус JC, вирус японского энцефалита, аренавирус Хунин, KI полиомавирус, кунджин вирус, вирус летучих мышей Лагоса, марбургвирус озера Виктория, вирус Лангат, вирус Ласса, вирус Лордсдейл, вирус энцефаломиелита, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Мачупо, вирус Маяро, MERS коронавирусы, вирус кори, вирус энцефаломиокардита Менго, полиомавирус клеток Меркеля, вирус Мокола, вирус контагиозного моллюска, вирус оспы обезьян, вирус паротита, вирус энцефалита долины Мюррей, нью-йоркский вирус, вирус Нипах, норовирус, вирус Норуок, вирус Онгонг-Ньонг, вирус контагиозного пустулезного дерматита, вирус Оропуш, вирус Пичинде, полиовирус, флебовирус Пунта Торо, вирус Пуумала, вирус бешенства, вирус лихорадки Рифт-Валли, росавирус А, вирус реки Росс, ротавирус (например ротавирус А, ротавирус В, ротавирус С, ротавирус Х), вирус краснухи, вирус Сагияма, саливирус А,

вирус сицилийской москитной лихорадки, вирус Саппоро, вирус леса Семлики, сеульский вирус, пенистый вирус обезьян, вирус 5 обезьян, вирус Синдбис, вирус Саутгемптон, вирус энцефалита Сент-Луиса, клещевой вирус Повассан, вирус Торк Тено, вирус Тоскана, вирус УукуниEMI, вирус осповакцины, вирус ветряной оспы, вирус натуральной оспы, вирус венесуэльского конского энцефалита, вирус везикулярного стоматита, вирус западного конского энцефалита, полиомавирус WU, вирус Западного Нила, вирус опухоли обезьяны Яба, вирус Яба-подобной болезни, вирус желтой лихорадки, и вирус Зика.

[0064] В некоторых вариантах осуществления геном, экзом, транскриптом, протеом, или ORFом (набор открытых рамок считывания) по изобретению представляет собой раковый геном, экзом, транскриптом, протеом, или ORFом. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает известные раковые неопитоты. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены из известных раковых антигенных белков. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены из генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены из связанных с раком генов. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены из мутационных раковых драйверных генов. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены из протоонкогенов, онкогенов или генов-супрессоров опухолей. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены из протоонкогенов, онкогенов или генов-супрессоров опухолей, при этом k-меры включают мутации, как описано здесь (например аминокислотные замещения, замещения аланином, обеспечивающие позиционное сканирование, обеспечивающие комбинаторное позиционное сканирование и так далее).

[0065] Неограничивающие примеры рака включают острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), аденокарциному, связанные со СПИДом виды рака, связанную со СПИДом лимфому, анальный рак, рак аппендикса, астроцитому, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, базально-клеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, опухоль головного мозга, рак молочной железы, бронхиальные опухоли, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, карциному неизвестного происхождения, опухоль сердца, рак центральной

нервной системы, рак шейки матки, холангиокарциному, хордому, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелолейкоз (CML), хронические миелопролиферативные новообразования, колоректальный рак, краниофарингиому, кожную Т-клеточную лимфому, карциному протоков *in situ*, эмбриональную опухоль, рак эндометрия, эпителиальный рак, эпендимому, рак пищевода, эстезионейробластому, саркому Юинга, опухоль экстракраниальных зародышевых клеток, опухоль внегонадных зародышевых клеток, рак глаза, рак маточной трубы, фиброзную гистиоцитому кости, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), опухоли зародышевых клеток, гестационную трофобластическую болезнь, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, внутриглазную меланому, опухоли островковых клеток, саркому Капоши, рак почки (почечно-клеточный), гистиоцитоз клеток Лангерганса, рак гортани, лейкемию, рак губы и полости рта, рак печени, рак легких (немелкоклеточный и мелкоклеточный), лимфому, рак груди у мужчин, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости и остеосаркому, меланому, карциному из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический рак, метастатический плоскоклеточный рак шеи с оккультной первичной опухолью, карциному средней линии, рак рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому, грибковый микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические / миелопролиферативные новообразования, рак носовой полости, рак носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак ротовой полости, рак губы и полости рта, рак глотки, остеосаркому, рак яичников, панкреатический рак, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, папилломатоз, параганглиому, рак околоносовых пазух, рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, опухоль гипофиза, новообразование плазматических клеток, плевропульмональную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы (ЦНС), первичный рак брюшины, рак простаты, рак прямой кишки, рецидив рака, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легких, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак кожи, плоскоклеточный рак шеи с оккультной первичной опухолью, рак желудка, т-клеточную лимфому, рак яичек, рак горла, тимому и тимическую карциному, рак щитовидной железы, переходный клеточный рак, рак мочеточника и почечного таза, рак уретры, рак матки, саркому матки, рак влагалища, сосудистые опухоли, рак вульвы, и опухоль Вильмса.

[0066] В некоторых вариантах осуществления геном, экзом, транскриптом, протеом, или ORFом (набор открытых рамок считывания) по изобретению представляет собой воспалительный или аутоиммуногенный геном, экзом, транскриптом, протеом, или ORFом. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает известные воспалительные или аутоиммуногенные неоэпитопы или собственные эпитопы. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены из известных воспалительных или аутоиммуногенных антигенных белков. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены из воспалительных или связанных с аутоиммунными реакциями генов. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает все k-мерные пептиды, которые могут быть получены на основе мутации воспалительных или связанных с аутоиммунными реакциями драйверных генов.

[0067] Неограничивающие примеры воспалительных или аутоиммунных заболеваний или состояний включают острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), острый некротический геморрагический лейкоэнцефалит, болезнь Эддисона, адьювант-индуцированный артрит, агаммаглобулинемию, очаговую алопецию, амилоидоз, анкилозирующий спондилоартрит, анти-GBM / анти-TBM нефрит, антифосфолипидный синдром (APS), аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунную апластическую анемию, аутоиммунную дизавтономию, аутоиммунную атрофию желудка, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунную гиперлипидемию, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ATP), аутоиммунное заболевание щитовидной железы, аутоиммунную крапивницу, аксональные и нейрональные невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Кастлемана, глютенную болезнь, болезнь Шагаса, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP), хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит (CRMO), синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид / доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки, болезнь Крона, синдром Коганса, коллаген-индуцированный артрит, болезнь холодовых агглютининов, врожденную блокаду сердца, миокардит Коксаки, болезнь CREST, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, демиелинизирующие невропатии, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девича (оптический нейромиеелит),

дискоидную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит, эозинофильный фасциит, узловатую эритему, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, синдром Эванса, фибромиалгию, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом (GPA) (ранее назывался гранулематоз Вегенера), болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, пурпуру Шенлейна-Геноха, герпес беременности, гипогаммаглобулинемию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), IgA нефропатию, связанную с IgG4 склерозирующую болезнь, иммунорегуляторные липопроотеины, миозит с включенными тельцами, интерстициальный цистит, воспалительное заболевание кишечника, ювенильный артрит, ювенильный олигоартрит, юношеский диабет (диабет 1 типа), ювенильный миозит, синдром Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склеротический лишай, деревянистый конъюнктивит, линейную IgA болезнь (LAD), волчанку (SLE), болезнь Лайма, хроническую, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит, смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язву Мурена, болезнь Муха-Хаберманна, рассеянный склероз, миастению, миозит, нарколепсию, оптический нейромиеелит (Девича), нейтропению, диабет без ожирения, глазной рубцовый пемфигоид, оптический неврит, палиндромный ревматизм, рANDAS (детские аутоиммунные психоневрологические расстройства, связанные со стрептококком), паранеопластическую дегенерацию мозжечка, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Парри Ромберга, синдром Парсоннажа-Тернера, парспланит (периферический увеит), пузырчатку, пузырчатку обыкновенная, периферическую невропатию, перивенозный энцефаломиелит, злокачественную анемию, рOEMS синдром, узелковый полиартериит, аутоиммунные полиглангулярные синдромы I, II и III типов, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постмиокардиальный синдром, постперикардитомический синдром, прогестероновый дерматит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, псориаз, бляшечный псориаз, псориатический артрит, идиопатический фиброз легких, гангренозную пиодермию, чистую аплазию эритроцитов, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторную симпатическую дистрофию, синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног, забрюшинный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермию, склерозирующий холангит, склерозирующий сиаладенит,

синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром скованного человека, подострый бактериальный эндокардит (SBE)), синдром Сусака, симпатическую офтальмию, системную красную волчанку (SLE), системный склероз, артериит Такаясу, височный артериит / гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР), синдром Толоса-Ханта, поперечный миелит, сахарный диабет I типа, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, везикулобуллезный дерматоз, витилиго, гранулематоз Вегенера (теперь называемый гранулематозом с полиангиитом (GPA)). Неограничивающие примеры воспалительных или аутоиммунных заболеваний или состояний включают инфекцию, например хроническую инфекцию, скрытую инфекцию, медленную инфекцию, устойчивую вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, микоплазматическую инфекцию или паразитарную инфекцию.

[0068] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению может включать пептиды с посттрансляционными модификациями, включая, например, ацетилирование, амидирование, биотинилирование, дезамидирование, фарнезилирование, формилирование, геранилгеранилирование, глутатионилирование, гликирование, гликозилирование, гидроксилирование, метилирование, моно-АДФ-рибозилирование, миристоилирование, N-ацетилирование, N-гликозилирование, N-миристоилирование, нитрозилирование, окисление, пальмитоилирование, фосфорилирование, поли(АДФ-рибозил)ирование, стеароилирование, сульфатирование, SUMOилирование, убиквитинилирование или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления пептид по изобретению может включать один или несколько селеноцистеиновых остатков.

[0069] В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-мРНК. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-мРНК, включающего пурамициновую связь. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-мРНК-кДНК. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-ДНК. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-ДНК, включающего связь биотин-стрептавидин. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-кДНК. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-рибосома-мРНК. В некоторых вариантах осуществления

пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-рибосома-мРНК, при этом мРНК содержит спейсерную последовательность без стоп-кодона. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению представляет собой часть комплекса белок-рибосома-мРНК-кДНК (PRMC).

[0070] В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению очищен с помощью очистки с использованием аффинных меток (например с использованием FLAG-метки). В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению включает ферментативную последовательность HaloTag. В некоторых вариантах осуществления пептиды в библиотеке по изобретению включают авидин или стрептавидин.

[0071] В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению может быть связан или слит с другой молекулой. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению может быть связан или слит с дополнительным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению может быть связан или слит с полинуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению может быть связан или слит с ДНК. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению может быть связан или слит с РНК. В некоторых вариантах осуществления пептид в библиотеке по изобретению может существовать в рамках более крупного окружения, например в качестве части более крупной последовательности белка или комплекса белка.

[0072] Библиотека по изобретению может включать около 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} , 10^{17} , 10^{18} , 10^{19} , 10^{20} , $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^8$, $2 \cdot 10^9$, $2 \cdot 10^{10}$, $2 \cdot 10^{11}$, $2 \cdot 10^{12}$, $2 \cdot 10^{13}$, $2 \cdot 10^{14}$, $2 \cdot 10^{15}$, $2 \cdot 10^{16}$, $2 \cdot 10^{17}$, $2 \cdot 10^{18}$, $2 \cdot 10^{19}$, $2 \cdot 10^{20}$, $2 \cdot 10^{21}$, $2 \cdot 10^{22}$, $2 \cdot 10^{23}$, $2 \cdot 10^{24}$, $2 \cdot 10^{25}$, $2 \cdot 10^{26}$, $2 \cdot 10^{27}$, $2 \cdot 10^{28}$, $2 \cdot 10^{29}$ или $2 \cdot 10^{30}$ пептидов или антигенов.

[0073] Библиотека по изобретению может включать более, по меньшей мере, около 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} , 10^{17} , 10^{18} , 10^{19} , 10^{20} , $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^8$, $2 \cdot 10^9$, $2 \cdot 10^{10}$, $2 \cdot 10^{11}$, $2 \cdot 10^{12}$, $2 \cdot 10^{13}$, $2 \cdot 10^{14}$, $2 \cdot 10^{15}$, $2 \cdot 10^{16}$, $2 \cdot 10^{17}$, $2 \cdot 10^{18}$, $2 \cdot 10^{19}$, $2 \cdot 10^{20}$, $2 \cdot 10^{21}$, $2 \cdot 10^{22}$, $2 \cdot 10^{23}$, $2 \cdot 10^{24}$, $2 \cdot 10^{25}$, $2 \cdot 10^{26}$, $2 \cdot 10^{27}$, $2 \cdot 10^{28}$, $2 \cdot 10^{29}$ или $2 \cdot 10^{30}$ пептидов или антигенов.

[0074] Библиотека по изобретению может включать не более чем около 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} , 10^{17} , 10^{18} , 10^{19} , 10^{20} , $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^8$, $2 \cdot 10^9$, $2 \cdot 10^{10}$, $2 \cdot 10^{11}$, $2 \cdot 10^{12}$, $2 \cdot 10^{13}$, $2 \cdot 10^{14}$, $2 \cdot 10^{15}$, $2 \cdot 10^{16}$, $2 \cdot 10^{17}$, $2 \cdot 10^{18}$, $2 \cdot 10^{19}$, $2 \cdot 10^{20}$, $2 \cdot 10^{21}$, $2 \cdot 10^{22}$, $2 \cdot 10^{23}$, $2 \cdot 10^{24}$, $2 \cdot 10^{25}$, $2 \cdot 10^{26}$, $2 \cdot 10^{27}$, $2 \cdot 10^{28}$, $2 \cdot 10^{29}$ или $2 \cdot 10^{30}$ пептидов или антигенов.

[0075] k-мер по изобретению может представлять собой 1-мер, 2-мер, 3-мер, 4-мер, 5-мер, 6-мер, 7-мер, 8-мер, 9-мер, 10-мер, 11-мер, 12-мер, 13-мер, 14-мер, 15-мер, 16-мер, 17-мер, 18-мер, 19-мер, 20-мер, 21-мер, 22-мер, 23-мер, 24-мер, 25-мер, 26-мер, 27-мер, 28-мер, 29-мер, 30-мер, 31-мер, 32-мер, 33-мер, 34-мер, 35-мер, 36-мер, 37-мер, 38-мер, 39-мер, 40-мер, 41-мер, 42-мер, 43-мер, 44-мер, 45-мер, 46-мер, 47-мер, 48-мер, 49-мер или 50-мер.

[0076] Библиотека по изобретению может включать пептиды приблизительно с 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 ограниченными остатками на один пептид. Библиотека по изобретению может включать пептиды приблизительно с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 переменными остатками на один пептид.

[0077] Библиотека по изобретению может включать пептиды с более чем, по меньшей мере, приблизительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 ограниченных остатков на один пептид. Библиотека по изобретению может включать пептиды с более чем, по меньшей мере, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 переменных остатков на один пептид.

[0078] Библиотека по изобретению может включать пептиды с не более чем приблизительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 ограниченных остатков на один пептид. Библиотека по изобретению может включать пептиды с не более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 переменных остатков на один пептид.

Подмножества пептидных библиотек

[0079] Пептидная библиотека может представлять собой подмножество объективной библиотеки. В некоторых вариантах осуществления может применяться алгоритм для отбора пептидов в пептидной библиотеке по изобретению. Например, может применяться алгоритм для предсказания пептидов, которые с наибольшей вероятностью подвергаются фолдингу или обеспечивают докинг в кармане связывания МНС/HLA, при этом пептиды, превышающие определенное пороговое значение, могут быть выбраны для включения в библиотеку. В некоторых вариантах осуществления выбор пептидов для библиотеки по изобретению включает приоритизацию пептидов на основе предсказанной аффинности связывания для определенного типа HLA. В некоторых вариантах осуществления выбор пептидов для библиотеки по изобретению предусматривает приоритизацию типов HLA или аллелей на основе превалирования в популяции, например популяции людей.

[0080] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает пептиды, выбранные на основе скринингового анализа, например функционального анализа на предмет фолдинга. Анализ может применяться для тестирования на успешность фолдинга пептида по изобретению. Например, в рамках анализа может применяться моноклональное антитело для определения успешного фолдинга полипептида, например связывание BB7.2 моноклонального антитела может указывать на успешный фолдинг HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления подвергнутые правильным образом фолдингу пептиды отделяются от подвергнутых неправильным образом фолдингу пептидов, могут быть определены последовательности подвергнутых правильным образом фолдингу пептидов и подвергнутых неправильным образом фолдингу пептидов (например путем секвенирования описанных здесь идентификаторов), при этом последующая библиотека может быть обогащена подвергнутыми правильным образом фолдингу пептидами (**Фиг.6**).

[0081] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает известные, детектированные или предсказанные неоэпитопы рака (например колоректального рака или немелкоклеточного рака легкого). В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает последовательности, связанные или обогащенные в плане определенного заболевания или состояния.

Библиотеки антигенов

[0082] В рамках данного изобретения предусмотрены пептидные библиотеки, которые могут применяться в рамках ряда скрининговых анализов для идентификации потенциальных диагностических или терапевтических мишеней или агентов. Пептидная

библиотека может представлять собой библиотеку антигенов. Изобретение включает библиотеки антигенов с вариантами использования в рамках анализов, связанных с иммунными антигенами, включая Т-клеточные антигены, которые включают Т-клеточные эпитопы. Т-клеточные антигены и эпитопы могут сильно влиять на функционирование приобретенного иммунитета, поскольку они представляют собой определенные последовательности, которые распознают Т-клеточные рецепторы (TCR). Распознавание TCR родственного антигена может быть важным, например, в плане иммунного распознавания и эффекторных иммунных ответов против патогена, иммунного распознавания и эффекторных иммунных ответов против раковых клеток, и аутоиммунных ответов (например иммунных ответов против собственных тканей, приводящих к заболеванию).

[0083] Библиотеки антигенов для скрининга Т-клеточных эпитопов, таким образом, могут потенциально применяться, например, в рамках мер по исследованию, диагностике, лечению и предотвращению, связанных с инфекционными заболеваниями, раком, и аутоиммунными заболеваниями. Идентификация последовательностей антигенных пептидов, распознаваемых Т-клетками, является критически важной, например, для разработки вакцин (например для идентификации защитных антигенов для определенного патогена или идентификации неоантигенов для применения в рамках вакцины против рака), для терапии рака (например для идентификации мишеней для терапии на основе Т-клеток, включая идентификацию неоантигенов), и для аутоиммунных исследований и лечения (например для идентификации аутоиммунных антигенов).

[0084] Существует, однако, ряд трудностей, связанных с получением и применением пептидных библиотек для видов использования, связанных с Т-клеточными антигенами и эпитопами. Огромное количество потенциально релевантных возможных пептидных последовательностей вызывает трудности в плане получения библиотек. Для пептида длиной 9 остатков (9-мера) существует 20^9 (приблизительно $5,1 \times 10^{11}$) возможных комбинаций последовательностей 20 аминокислот, которые наиболее часто встречаются в белках. Как описано ниже, некоторые пептиды, презентруемые Т-клеткам, могут иметь длину более 9 остатков, таким образом разнообразие потенциальных пептидов, распознаваемых TCR, может превышать $5,1 \times 10^{11}$. Кроме того, источники потенциальных представляющих интерес антигенных пептидов (например патогены, раковые клетки, ткани) могут экспрессировать тысячи белков, при этом каждый белок включает совокупность потенциальных пептидных антигенов. Требуются эффективные

высокопроизводительные способы получения любой библиотеки с подобным разнообразием.

[0085] Дополнительные трудности связаны с тем, как именно пептиды должны быть презентированы TCR для инициирования связывания с достаточной аффинностью, чтобы обеспечивать возможность их применения в рамках экспериментального или терапевтического контекста. *In vivo* TCR распознают пептиды, презентруемые молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Для связывания с TCR пептидные антигены пептидной библиотеки также должны быть презентированы в контексте МНС. Кроме того, для достижения связывания с достаточной аффинностью для возможности их применения в рамках экспериментального или терапевтического контекста требуются комплексы мультимера пептид-МНС (рМНС). Традиционные способы получения рМНС мультимеров являются низкопроизводительными и трудозатратными, при этом получаемые полипептиды склонны к неправильному фолдингу и плохой загрузке пептидного антигена.

[0086] Здесь описаны библиотеки разнообразных рМНС мультимеров и способы их получения, включая высокопроизводительные способы. В некоторых вариантах осуществления рМНС мультимеры дополнительно включают идентификаторы нуклеиновых кислот, обеспечивающие возможность удобного детектирования и количественного анализа связывания, как описано в других частях описания.

рМНС мультимеры

[0087] Пептиды презентруются TCR двумя основными классами МНС: МНС класса I (МНС-I) и МНС класса II (МНС-II). У человека МНС также обозначается как лейкоцитарный антиген человека (HLA). Кодрующие HLA гены являются высоковариабельными среди различных людей, при этом различные HLA гены могут иметь различные характеристики в плане связывания пептидов и презентирования антигенов. Человек имеет три основных гена МНС класса I, известные как HLA-A, HLA-B, и HLA-C. Белки, продуцируемые на основе данных генов, присутствуют на поверхности практически всех клеток. Дополнительные неклассические гены класса I включают HLA-E, HLA-F, и HLA-G. У человека существует шесть основных генов МНС класса II: HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, и HLA-DRB1. Существует множество аллельных форм многих МНС генов, при этом каждый из них может презентировать совокупность пептидов в неглубокой антиген-связывающей бороздке, образованной двумя антипараллельными α -спиралями на β -листе. Презентруемые МНС-I пептиды могут быть связаны в виде удлиненной конформации как с N, так и C концом,

связанными внутри закрытой бороздки, что ограничивает их размер (например 8–10 остатками). Презентируемые МНС-II пептиды также могут быть связаны в виде удлиненной конформации, но вследствие открытой природы бороздки они могут иметь большую длину (например 14-20 остатков).

[0088] Для получения рМНС могут быть получены конструкторы для экспрессии субъединиц. Например, могут быть получены конструкторы для экспрессии тяжелой цепи МНС-I и бета-2-микроглобулина ($\beta 2m$). Трансмембранный домен тяжелой цепи может быть генетически удален для реализации очистки, при этом на С-конце может быть добавлен участок распознавания биотина. Каждый элемент в виде тяжелой цепи, $\beta 2m$, и пептида может быть экспрессирован, например рекомбинантно экспрессирован в виде включения в культурах *E. coli* или экспрессирован в эукариотических клетках, таких как клетки насекомых или млекопитающих. Участок распознавания биотина может быть биотинилирован, например, с применением фермента BirA. Затем тяжелая цепь, $\beta 2m$, и пептид могут быть обработаны денатурирующим агентом, подвергнуты повторному фолдингу в рМНС мономеры и очищены с помощью эксклюзионной хроматографии. МНС молекулы, которые не связываются корректным образом с пептидом, могут являться нестабильными, диссоциироваться, и подвергаться фолдингу неправильным образом. Аналогичный способ может применяться для получения комплексов пептид-МНС-II (рМНС-II).

[0089] Затем МНС мономеры могут быть подвергнуты мультимеризации для образования, например, димеров, тетрамеров, пентамеров, октомеров, стрептамеров или декстрамеров. Димеры могут быть получены путем генетического слияния внеклеточного домена МНС молекулы, например в виде продукта слияния с окружением на основе иммуноглобулина, которое связывается со вторым МНС. Тетрамеры могут быть получены, например, путем добавления "основной цепи" стрептавицина или авидина к МНС мономерам с биотинилированными С-концами. В качестве альтернативы домены стрептавицина могут быть экспрессированы в виде С-концевого продукта слияния с МНС цепью, обеспечивая самосборку в тетрамеры. МНС тетрамеры и октомеры могут быть также получены путем добавления точечной мутации в свободном цистеине на С-конце МНС цепи, которая может быть алкилирована производными йодацетамида или малеимида, содержащими биотин. Конъюгаты стрептавицина могут применяться для олигомеризации. Путем использования разветвленного пептида, содержащего один биотиновый и два малеимидных фрагмента (DMGS), данная стратегия обеспечивает получение октомерных комплексов МНС. МНС пентамеры могут быть получены путем образования комплекса из

пяти МНС мономеров с помощью самособирающегося домена спиральной катушки. МНС декстрамеры могут быть получены путем присоединения совокупности комплексов МНС, например десяти или более, к основной цепи полимера в виде декстрана. МНС стрептамеры могут быть получены путем связывания биотинилированных С-концов цепей МНС с основной цепью мультимеризованного Strep-Tactin® или Strep-tag®, что приводит к образованию комплекса, включающего 8-12 МНС мономеров.

Одноцепочечный pMHC

[0090] Молекулы МНС могут быть сконструированы в виде полипептидов одноцепочечный пептид-МНС (sc-pMHC), которые включают субъединицы собранного pMHC. Подобный sc-pMHC может, например, упрощать загрузку пептидного антигена в бороздку связывания МНС. Подобный sc-pMHC также может, например, промотировать эффективную загрузку связанного пептидного антигена, в отличие от других загрязненных пептидов, которые могут занимать бороздку связывания. Sc-pMHC мультимеры могут демонстрировать специфичное и зависящее от дозировки связывание с антиген-специфическими Т-клетками (**Фиг.12**).

[0091] sc-pMHC может включать антигенный пептид, тяжелую цепь и/или бета-2-микроглобулин ($\beta 2m$), соответствующий МНС-I. МНС-I sc-pMHC может включать антигенный пептид и тяжелую цепь. МНС-I sc-pMHC может включать антигенный пептид и $\beta 2m$. МНС-I sc-pMHC может включать антигенный пептид, бета-2-микроглобулин ($\beta 2m$), и тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления МНС-I sc-pMHC может включать один полипептид с антигенным пептидом и гибким линкером, который присоединяет антигенный пептид к тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления МНС-I sc-pMHC может дополнительно включать другой гибкий линкер, который соединяет $\beta 2m$ с антигенным пептидом или тяжелой цепью. В некоторых вариантах осуществления МНС-I sc-pMHC может включать один полипептид с антигенным пептидом и гибким линкером, который присоединяет антигенный пептид к $\beta 2m$. В некоторых вариантах осуществления МНС-I sc-pMHC может дополнительно включать другой гибкий линкер, который соединяет тяжелую цепь с антигенным пептидом или $\beta 2m$.

[0092] sc-pMHC может включать антигенный пептид, альфа-цепь и/или бета-цепь, соответствующие МНС-II. МНС-II sc-pMHC может включать антигенный пептид и альфа-цепь. МНС-II sc-pMHC может включать антигенный пептид и бета-цепь. МНС-II sc-pMHC может включать антигенный пептид, альфа-цепь, и бета-цепь. МНС-II sc-pMHC может включать один полипептид с антигенным пептидом и гибким линкером, который присоединяет антигенный пептид к бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления

МНС-II sc-pМНС может дополнительно включать другой гибкий линкер, который соединяет альфа-цепь с антигенным пептидом или бета-цепью. В некоторых вариантах осуществления МНС-II sc-pМНС может включать один полипептид с антигенным пептидом и гибким линкером, который присоединяет антигенный пептид к альфа-цепи. В некоторых вариантах осуществления МНС-II sc-pМНС может дополнительно включать другой гибкий линкер, который соединяет бета-цепь с антигенным пептидом или альфа-цепью.

[0093] sc-pМНС может иметь любой порядок, например иметь пептид на С-конце одного полипептида для обеспечения большего разнообразия на N-конце антигенного пептида. Могут применяться другие механизмы для достижения большего разнообразия на N-конце, если антигенный пептид присутствует на N-конце, например ферментативное расщепление N-конца. sc-pМНС мономеры могут быть подвергнуты мультимеризации, как описано для МНС мономеров выше, например для образования, к примеру, димеров, тетрамеров, пентамеров, октомеров, стрептамеров или декстрамеров.

[0094] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает совокупность sc-pМНС. В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает совокупность sc-pМНС, при этом k-мерные последовательности располагаются в рамках части sc-pМНС в виде антигенного пептида.

[0095] Мультимеры пептид-МНС или антитела, которые специфически связываются с pМНС мультимерами, могут быть конъюгированы с флуоресцентной меткой, что обеспечивает возможность идентификации Т-клеток, которые связываются с мультимером пептид-МНС, например с помощью проточной цитометрии или микроскопии. Т-клетки также могут быть отобраны на основе флуоресцентной метки с помощью, например, сортировки клеток на основе флуоресценции. Однако ограничение данного подхода связано с количеством доступных различных флуоресцентных меток и детекторов, что ограничивает применение способов на основе флуоресценции для высокопроизводительного скрининга антигенных библиотек.

[0096] В некоторых вариантах осуществления библиотека по изобретению включает sc-pМНС мультимеры, конъюгированные с нуклеотидными идентификаторами, как описано в других частях описания, что обеспечивает возможность удобного детектирования и количественного анализа антиген-специфического связывания с TCR. Подобная библиотека может, например, обеспечивать возможность детектирования Т-клеток, являющихся специфическими для определенного антигена, множественное детектирование специфичностей Т-клеток в определенном образце, сопоставление

последовательности TCR со специфичностью (например с помощью секвенирования на основе одной клетки), сравнительное определение аффинности TCR, определение консенсусной последовательности специфичности определенного TCR, или картирование антигенной чувствительности Т-клеток против представляющих интерес последовательностей.

Линкеры

[0097] В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает полипептидные последовательности, в которых две полипептидные последовательности или домена соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает полипептидные последовательности, в которых три или более полипептидные последовательности или доменов соединены линкерами. В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает полипептидные последовательности, в которых четыре или более полипептидные последовательности или доменов соединены линкерами. В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает полипептидные последовательности, в которых пять или более полипептидные последовательности или доменов соединены линкерами. В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает полипептидные последовательности, в которых шесть или более полипептидные последовательности или доменов соединены линкерами.

[0098] Линкер может представлять собой химическую связь, например одну или несколько ковалентных связей или нековалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нековалентную связь. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Подобный линкер может иметь длину 2-30 аминокислот или более. В некоторых вариантах осуществления линкер может применяться, например, для отделения полипептидных последовательностей или доменов друг от друга. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть расположен между доменами, например для обеспечения молекулярной гибкости вторичных и третичных структур. Линкер может включать описанные здесь гибкие, жесткие, и/или расщепляемые линкеры. В некоторых вариантах осуществления линкер включает, по меньшей мере, одну аминокислоту в виде глицина, аланина и серина для обеспечения гибкости. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гидрофобный линкер, например включающий отрицательно заряженную сульфонатную группу, полиэтиленгликолевую (ПЭГ) группу, или группу сложного диэфира пироглутамата. В

некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым для селективного отделения полипептидных последовательностей или доменов друг от друга, но достаточно стабильным для предотвращения преждевременного расщепления.

[0099] Гибкие пептидные линкеры могут иметь последовательности, состоящие в основном из цепей Gly и Ser остатков ("GS" линкер). Гибкие пептидные линкеры могут применяться для объединения доменов, которые требуют определенной степени движения или взаимодействия, и могут включать малые, неполярные (например Gly) или полярные (например Ser или Thr) аминокислоты. Вставка Ser или Thr может промотировать стабильность линкера в водных растворах за счет образования водородных связей с молекулами воды, тем самым снижая нежелательные взаимодействия между линкером и фрагментами белка. Гибкие линкеры могут включать, например, отдельные копии или повторы любой из последовательностей, перечисленных в ТАБЛИЦЕ 1.

ТАБЛИЦА 1	
SEQ ID NO:	Последовательность
1	GGGGS
2	GGGGGG
3	GGGGGGGG
4	KESGSVSSEQLAQFRSLD
5	EGKSSGSGSESKST
6	GSAGSAAGSGEF

[0100] Жесткие линкеры могут применяться для сохранения фиксированного расстояния между доменами. Жесткие линкеры также могут применяться, когда пространственное разделение доменов является критически важным для сохранения стабильности или биоактивности одного или нескольких компонентов. Жесткие линкеры могут иметь структуру в виде альфа-спирали или богатой Pro последовательности. Жесткие линкеры могут, например, включать последовательности (EAAAK)_n, A(EAAAK)_nA (XP)_n, где n обозначает любое количество повторов (например 2-5), а X обозначает любую аминокислоту (например Ala, Lys, или Glu).

[0101] Расщепляемый пептидный линкер может применяться для обеспечения удаления или отщепления полипептидной последовательности или домена. В некоторых вариантах осуществления линкер может расщепляться при определенных условиях, например при присутствии восстанавливающих реагентов или ферментов. *In vivo* расщепление линкеров в продуктах слияния может осуществляться с помощью ферментов или протеаз, которые

экспрессируются *in vivo* при определенных условиях, в определенных клетках или тканях, или заключены в определенных клеточных компартментах. Специфичность многих ферментов или протеаз может обеспечивать более медленное расщепление линкера в ограниченных компартментах. Например, расщепляемый линкер может включать последовательность расщепления для матриксной металлопротеиназы (MMP) или другой протеазы. Другой пример включает чувствительную к тромбину последовательность (например PRS) между двумя Cys остатками. *In vitro* обработка CPRSC тромбином приводит к расщеплению чувствительной к тромбину последовательности, в то время как обратимая дисульфидная связь остается интактной. Подобные линкеры известны и описаны, например, в Chen et al. 2013. Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357–1369.

[0102] В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой пептидную связь, например С-конец пептидной последовательности или домен может быть слит с N-концом другой пептидной последовательности или доменом с помощью пептидной связи.

[0103] Дополнительные примеры линкеров включают гидрофобные линкеры, например отрицательно заряженные сульфонатные группы; липиды, например поли(--CH₂--) углеводные цепи, такие как полиэтиленгликолевые (ПЭГ) группы, их ненасыщенные варианты, гидроксильированные варианты, амидированные или иным образом N-содержащие варианты; неуглеводные линкеры; углеводные линкеры; фосфодиэфирные линкеры, или иные молекулы, способные ковалентно связывать два или более полипептида. Также могут применяться нековалентные линкеры, например биотин-стрептавидиновые линкеры.

Пептидные идентификаторы

[0104] В рамках данного изобретения предусмотрены пептидные библиотеки, включая, например, пептидные библиотеки с высоким разнообразием, которые могут применяться в рамках ряда терапевтических и диагностических анализов. Данные предусмотренные пептидные библиотеки могут применяться, например, для скрининга специфических в плане заболевания или органа пептидов, для скрининга пептидов с терапевтическими вариантами использования, для скрининга пептидов с диагностическими вариантами использования, для скрининга нацеленных против опухолей пептидов, для скрининга эпитопов или антигенов антител, для скрининга Т-клеточных эпитопов или антигенов, для скрининга противомикробных пептидов, или для любой их комбинации.

[0105] Анализы с использованием пептидных библиотек могут быть ограничены вследствие способов, необходимых для детектирования и количественного анализа отдельных пептидов. Идентификаторы нуклеиновых кислот могут применяться для мечения каждого пептида в библиотеке уникальной последовательностью нуклеиновой кислоты, что обеспечивает возможность детектирования и количественного анализа отдельных пептидов с помощью способов на основе нуклеиновых кислот, например ПЦР амплификации или секвенирования ДНК. Идентификатор нуклеиновых кислот может представлять собой уникальную последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления идентификаторы нуклеиновых кислот обеспечивают возможность детектирования и количественного анализа отдельных пептидов, когда совокупность пептидов объединена в рамках общего экспериментального условия. В некоторых вариантах осуществления идентификаторы нуклеиновых кислот обеспечивают возможность детектирования и количественного анализа отдельных пептидов, когда все пептиды пептидной библиотеки объединены в рамках общего экспериментального условия. В некоторых вариантах осуществления идентификаторы нуклеиновых кислот могут применяться для мечения нуклеиновых кислот (например ДНК, мРНК, кДНК) в рамках экспериментального условия для сопоставления с пептидом пептидной библиотеки, присутствующим в рамках того же экспериментального условия и имеющим тот же идентификатор нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления идентификаторы нуклеиновых кислот обеспечивают возможность проверки разнообразия библиотеки, когда идентификаторы нуклеиновых кислот подвергают секвенированию ДНК и сопоставляют наблюдаемые результаты считывания с предсказываемыми последовательностями библиотеки для идентификации присутствия или отсутствия пептидов в библиотеке (**Фиг.7**). В некоторых вариантах осуществления идентификаторы дополнительно применяются для нормализации результатов количественного анализа на основе считывания. В некоторых вариантах осуществления идентификатор представляет собой самоидентификатор, который соответствует всей или части последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид, который он идентифицирует. В некоторых вариантах осуществления идентификатор не является самоидентификатором (то есть не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид, который он идентифицирует).

[0106] Идентификатор может иметь любую последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой одноцепочечный или двухцепочечный полинуклеотид ДНК. В некоторых вариантах

осуществления идентификатор может представлять собой полинуклеотид РНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой гибридный полинуклеотид ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать синтетические или химически модифицированные нуклеотиды или конъюгаты (например для повышения стабильности или реализации присоединения к пептиду).

[0107] Идентификаторы нуклеиновых кислот могут быть присоединены к пептидам ковалентно или нековалентно.

[0108] Белки или пептиды могут иметь идентификатор, присоединенный с помощью способа трансляции *in vitro* для получения комплексов белок-мРНК, комплексов белок-мРНК-кДНК, комплексов белок-ДНК, комплексов белок-кДНК, комплексов белок-рибосома-мРНК, или комплексов белок-рибосома-мРНК-кДНК (PRMC), которые могут содержать синтетические идентификаторы на 5'-конце открытых рамок считывания белка (ORF). В некоторых вариантах осуществления может быть реализован мРНК дисплей с помощью мРНК матриц, включающих пуромидин, и системы *in vitro* трансляции (IVT), включающей очищенные компоненты. Комплексы мРНК-белок, несущие представляющие интерес белки, могут быть обогащены с помощью очистки с использованием аффинных меток, например очистки с использованием FLAG-метки. В некоторых вариантах осуществления может быть реализован рибосомный дисплей с помощью мРНК матриц, включающих спейсерные последовательности без стоп-кодонов, и системы *in vitro* трансляции (IVT), включающей очищенные компоненты. Комплексы белок-рибосома-мРНК, несущие представляющие интерес белки, могут быть обогащены с помощью очистки с использованием аффинных меток, например очистки с использованием FLAG-метки. В некоторых вариантах осуществления может быть реализован рибосомный дисплей с помощью гибридов мРНК-кДНК в качестве матриц и системы *in vitro* трансляции (IVT), включающей очищенные компоненты. PRMC комплексы, несущие представляющие интерес белки, могут быть обогащены с помощью очистки с использованием аффинных меток, например очистки с использованием FLAG-метки. В некоторых вариантах осуществления может быть реализован ДНК дисплей с помощью биотинилированных ДНК матриц и системы *in vitro* транскрипции, включающей очищенные компоненты. Комплексы белок-ДНК могут образовываться за счет связывания биотина и стрептавидина, при этом комплексы белок-ДНК могут быть обогащены с помощью очистки с использованием аффинных меток, например очистки с использованием FLAG-метки. В некоторых вариантах осуществления мРНК синтезируют

из ДНК в виде части системы *in vitro* транскрипции и трансляции. В некоторых вариантах осуществления кДНК подвергают обратной транскрипции из мРНК до или после очистки комплекса, включающего пептид и мРНК.

[0109] Идентификатор может быть присоединен к белку или пептиду ферментативно. Например, может быть получен слитый белок, включающий ферментативную последовательность HaloTag, при этом ферментативная активность может обеспечивать ковалентное конъюгирование слитого белка с модифицированной HaloTag двухцепочечной ДНК.

[0110] Идентификатор может быть присоединен к белку или пептиду с помощью нековалентных взаимодействий. Например, биотинилированные полинуклеотидные идентификаторы могут связываться с авидином или стрептавидином, связанным с пептидом. Авидин или стрептавидин может представлять собой часть пептидной последовательности или может быть связан с ней каким-то другим образом, например в виде основной цепи стрептавидаина, используемой в рамках мультимера белка.

[0111] В некоторых вариантах осуществления уникальный идентификатор может применяться для каждого уникального пептида в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления идентификаторы могут являться общими для двух или более пептидов в пептидной библиотеке, например когда пептиды включают одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления идентификаторы могут включать последовательность, являющуюся общей для нескольких или всех пептидов библиотеки, и последовательность, которая является уникальной для пептида в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления идентификаторы могут включать одну или несколько частей последовательности, являющейся общей для нескольких или всех пептидов библиотеки, и одну или несколько других частей последовательности, являющейся уникальной для пептида в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления последовательность, являющаяся общей для идентификаторов, может применяться для амплификации идентификатора (например ПЦР амплификации с подходящими праймерами). В некоторых вариантах осуществления последовательность, являющаяся уникальной для одного идентификатора или общей для подмножества идентификаторов, может использоваться для детектирования или количественного анализа с помощью кПЦР (например последовательности для гидролизных зондов, например TaqMan зондов). В некоторых вариантах осуществления последовательность, являющаяся уникальной для одного идентификатора или общей для подмножества идентификаторов, может

использоваться для детектирования или количественного анализа с помощью секвенирования.

[0112] В некоторых вариантах осуществления идентификаторы нуклеиновых кислот могут включать последовательности, которые кодируют аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления два или более идентификатора нуклеиновых кислот могут включать различные последовательности, которые кодируют одну аминокислоту (например используют различные кодоны). В некоторых вариантах осуществления использование различающихся кодонов в рамках идентификаторов нуклеиновых кислот может обеспечивать хранение дополнительной информации в идентификаторах.

[0113] В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать уникальную полученную *in silico* последовательность; каждая последовательность идентификатора может быть присвоена его пептиду, включающему данную уникальную последовательность в библиотеке, при этом сопоставление идентификатор-пептид может храниться в базе данных. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует все или часть пептидных идентификаторов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует открытую рамку считывания. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать нуклеотидную последовательность, которая включает промоторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать нуклеотидную последовательность, которая включает участок связывания для связывающегося с ДНК белка, например фактор транскрипции или полимеразный фермент. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать одну или более последовательностей, являющихся мишенью нуклеазы, например рестрикционный фермент. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать, по меньшей мере, один элемент последовательности, необходимый для *in vitro* транскрипции и трансляции последовательности.

[0114] В других вариантах осуществления идентификатор может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует молекулу главного комплекса гистосовместимости (МНС) или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид одноцепочечный пептид-МНС (sc-pMHC) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенный пептид sc-pMHC.

[0115] В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса белок-мРНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса белок-мРНК, включающего пурамициновую связь. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса белок-мРНК-кДНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса белок-ДНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса белок-ДНК, включающего связь биотин-стрептавидин. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса белок-кДНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса белок-рибосома-мРНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса белок-рибосома-мРНК, при этом мРНК содержит спейсерную последовательность без стоп-кодона. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть гибрида мРНК-кДНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может представлять собой часть комплекса PRMC.

[0116] В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать HaloTag лиганд, например хлоралкановый линкер, связанный с функциональной группой, например биотин или флуоресцентный краситель.

[0117] В некоторых вариантах осуществления идентификатор может включать биотинилированную нуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может быть биотинилирован путем ПЦР амплификации с биотинилированным праймером (праймерами). В некоторых вариантах осуществления идентификатор может быть биотинилирован путем ферментативной вставки биотинилированной метки, например биотиновой метки dUTP, путем использования фермента ДНК-полимеразы Кленова, ник-трансляции или меченая РНК-полимераз смешанными праймерами, включая T7, T3, и SP6 РНК полимеразы. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может быть биотинилирован путем фотобиотинилирования, например образец может быть добавлен фотоактивируемый биотин и образец может быть подвергнут действию УФ-излучения.

[0118] В некоторых вариантах осуществления идентификатор может быть получен из матричного полинуклеотида, например с помощью ПЦР амплификации матричной ДНК. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может быть получен *de novo*, например с помощью химического синтеза, твердофазного синтеза ДНК, синтеза

олигонуклеотидов с помощью колонок, синтеза олигонуклеотидов с помощью микрочипов, или других способов синтеза. В некоторых вариантах осуществления матричный полинуклеотид может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует открытую рамку считывания. В некоторых вариантах осуществления матричный полинуклеотид может включать нуклеотидную последовательность, которая включает промоторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления матричный полинуклеотид может включать нуклеотидную последовательность, которая включает участок связывания для связывающегося с ДНК белка, например фактор транскрипции или полимеразный фермент. В некоторых вариантах осуществления матричный полинуклеотид может включать одну или более последовательностей, являющихся мишенью нуклеазы, например рестрикционный фермент. В некоторых вариантах осуществления матричный полинуклеотид может включать все элементы последовательности, необходимые для *in vitro* транскрипции и трансляции последовательности. В некоторых вариантах осуществления матричный полинуклеотид не включает все элементы последовательности, необходимые для *in vitro* транскрипции и трансляции последовательности. В некоторых вариантах осуществления матричные полинуклеотиды, кодирующие два или более идентификатора нуклеиновых кислот, могут включать различные последовательности, которые кодируют одни и те же аминокислоты (например используют различные кодоны). В некоторых вариантах осуществления использование различающихся кодонов в рамках матричных полинуклеотидов может применяться для идентификации класса или подкласса пептидов в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления использование различающихся кодонов в рамках идентификаторов нуклеиновых кислот может обеспечивать хранение дополнительной информации в матричном полинуклеотиде.

[0119] Идентификатор по изобретению может иметь любую длину. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину около 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500 или более нуклеотидов.

[0120] В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину более, по меньшей мере, около 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480 или 500 нуклеотидов.

[0121] В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину не более около 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500 или более нуклеотидов.

[0122] В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 4-500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 25-500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 27-300 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 27-120 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 50-120 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 80-120 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 40-50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 5-15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления идентификатор может иметь длину в диапазоне около 6-10 нуклеотидов.

Способы синтеза

[0123] Пептиды пептидной библиотеки могут быть синтезированы с помощью химических способов, например с помощью синтеза на основе "чайных пакетиков", цифровой фотолитографии, способа синтеза "pin" и SPOT синтеза. Например, может быть получен пептидный чип с помощью SPOT синтеза, при котором аминокислотные цепи получают на целлюлозной мембране путем повторяющихся циклов добавления аминокислот, и расщепления защитных групп на боковых цепях.

[0124] Биологические пептидные библиотеки, такие как фаговый дисплей, бактериальный дисплей или дрожжевой дисплей, включают слитые пептиды, а не выделенные молекулы. Биологические пептидные библиотеки могут быть подвергнуты ограничениям разнообразия и избыточности. Присутствие фаговых или бактериальных компонентов может приводить к связанным с нарушениями эффектам, например связыванию компонентов анализа с бактериальными компонентами вместо представляющего интерес пептида или иммунной активации через природные иммунные механизмы в анализе, включающем клетки.

[0125] Пептиды могут быть экспрессированы с помощью технологии рекомбинантных ДНК, например путем введения экспрессионного конструкта в бактериальные клетки, клетки насекомых или клетки млекопитающих, и очистки рекомбинантного белка от клеточных экстрактов. Однако полученные таким способом рекомбинантные белки зачастую экспрессируются в нерастворимом виде в виде растворимых агрегатов, могут подвергаться протеолизу или могут не обнаруживаться в клеточных экстрактах.

[0126] Пептиды могут синтезироваться путем *in vitro* транскрипции и трансляции, когда в рамках синтеза используются биологические принципы транскрипции и трансляции в контексте без использования клеток, например за счет матрицы нуклеиновой кислоты, соответствующих строительных блоков (например РНК, аминокислот), ферментов (например РНК полимеразы, рибосом), и условий. *In vitro* транскрипция и трансляция может включать синтез белков без использования клеток (CFPS). Пептид может быть синтезирован с помощью IVTT системы, которая может как обеспечивать транскрипцию, например ДНК конструкта в РНК, так и затем трансляцию РНК в белок. В некоторых вариантах осуществления ДНК или РНК конструкт включает пуромидин. В некоторых вариантах осуществления ДНК или РНК конструкт включает спейсерную последовательность без стоп-кодона.

[0127] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота по изобретению может быть получена *de novo*, например с помощью химического синтеза, твердофазного синтеза

ДНК, синтеза олигонуклеотидов с помощью колонок, синтеза олигонуклеотидов с помощью микрочипов, или других способов синтеза. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота по изобретению может быть получена из матричного полинуклеотида, например с помощью ПЦР амплификации матричной ДНК.

[0128] Нуклеотидная последовательность, кодирующая метиониновый остаток на N-конце пептида, и расщепляемый фрагмент могут быть закодированы в ДНК конструкте или РНК конструкте. Расщепляемый фрагмент расположен таким образом, что, по меньшей мере, один N-концевой аминокислотный остаток пептида располагается до или в рамках расщепляемого фрагмента. В некоторых вариантах осуществления способ включает кодирование расщепляемого фрагмента, который расположен таким образом, что один N-концевой аминокислотный остаток пептида располагается до или в рамках расщепляемого фрагмента. В некоторых вариантах осуществления указанный один N-концевой аминокислотный остаток представляет собой метиониновый остаток. Расщепляемый фрагмент может быть расщеплен с помощью фермента, например протеазы, являющегося специфичным в отношении расщепляемого фрагмента, который также может отщеплять расщепляемый фрагмент от оставшейся части пептида.

[0129] Пример расщепляемого фрагмента, который может быть закодирован в ДНК или РНК конструкте, как описано здесь, включает любой расщепляемый фрагмент, расщепляемый ферментом. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент может быть расщеплен протеазой. Расщепляемый фрагмент может быть отщеплен от пептида с помощью фермента, являющегося специфичным в отношении расщепляемого фрагмента. Фермент может представлять собой, например, фактор свертывания крови X, протеазу 3С риновируса человека, протеазу AcTEV™, протеазу WELQut, Genenase™, белок в виде небольшого убиквитин-подобного модификатора (SUMO), протеазу Ulp1 или энтерокиназу. Протеаза Ulp1 может отщеплять расщепляемый фрагмент определенным образом за счет распознавания третичной структуры вместо аминокислотной последовательности. Энтерокиназа (энтеропептидаза) также может применяться для отщепления расщепляемого фрагмента от пептида-кандидата. Энтерокиназа может обеспечивать расщепление после лизина в следующем участке расщепления: Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO.: 7). Энтерокиназа также может обеспечивать расщепления в других основных остатках в зависимости от последовательности и конформации белкового субстрата.

[0130] После трансляции конструкта, кодирующего пептид, N-концевой аминокислотный остаток может быть расщеплен для получения пептида для пептидной библиотеки с

высоким разнообразием. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один N-концевой аминокислотный остаток расщепляется для получения пептида. В некоторых вариантах осуществления расщепляется одна или более N-концевых аминокислот, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250 или более N-концевых аминокислотных остатков расщепляются для получения пептида. Указанная N-концевая аминокислота может представлять собой любой аминокислотный остаток. Указанная N-концевая аминокислота может представлять собой метиониновый аминокислотный остаток.

Способы получения и применения пептидных библиотек

[0131] Описанные здесь пептидные библиотеки могут применяться в различных анализах.

[0132] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь пептидные библиотеки могут применяться для выделения пар клетка-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ выделения пар клетка-пептид включает контактирование совокупности клеток с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 10, более 100, более 500, более 1000, более 2,000, более 5,000, более 10,000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов; и получение совокупности компартментов, при этом компартмент совокупности включает клетку совокупности клеток, связанную с пептидом пептидной библиотеки, что обеспечивает выделение пары клетка-пептид в компартменте. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека применяется для оценки пептидной библиотеки в плане выделения пар клетка-пептид после *de novo* определения мишеней. Пара клетка-мишень может представлять собой пару рецептор-лиганд. Пара клетка-пептид может представлять собой пару TCR-антиген. Пара клетка-пептид может представлять собой пару BCR-антиген. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии TCR. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии BCR. В некоторых вариантах осуществления нелимфоцитарная клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии TCR. В некоторых вариантах осуществления нелимфоцитарная клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии BCR. В некоторых вариантах осуществления пептид совокупности пептидов включает идентификатор, как описано здесь. Компартмент может

представлять собой отдельное пространство, например лунку, планшет, разделенную границу, фазовый сдвиг, сосуд, везикулу, клетку и так далее.

[0133] Описанные здесь способы и композиции могут применяться для идентификации пары клетка-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ идентификации пары клетка-пептид включает контактирование совокупности клеток с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 10, более 100, более 500, более 1000, более 2,000, более 5,000, более 10,000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов; компартиментализацию клетки совокупности клеток, связанной с пептидом пептидной библиотеки, в одном компартменте, при этом пептид включает уникальный пептидный идентификатор; и определение уникального пептидного идентификатора для каждого пептида, связанного с компартиментализованной клеткой. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека применяется для оценки пептидной библиотеки для идентификации пар клетка-пептид после *de novo* определения мишеней. Пара клетка-мишень может представлять собой пару рецептор-лиганд. Пара клетка-пептид может представлять собой пару TCR-антиген. Пара клетка-пептид может представлять собой пару BCR-антиген. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии TCR. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии BCR. В некоторых вариантах осуществления нелимфоцитарная клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии TCR. В некоторых вариантах осуществления нелимфоцитарная клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована для экспрессии BCR. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека представляет собой библиотеку антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность рМНС мультимеров, как описано здесь. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность sc-рМНС, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления пептид совокупности пептидов включает идентификатор, как описано здесь.

[0134] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь пептидные библиотеки могут применяться для выделения пар лимфоцит-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ выделения пар лимфоцит-пептид включает контактирование совокупности лимфоцитов с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека

включает более 10, более 100, более 500, более 1000, более 2,000, более 5,000, более 10,000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов; и получение совокупности компартментов, при этом компартмент совокупности включает лимфоцит совокупности лимфоцитов, связанный с пептидом пептидной библиотеки, что обеспечивает выделение пары лимфоцит-пептид в компартменте. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека применяется для оценки пептидной библиотеки в плане выделения пар лимфоцит-пептид после *de novo* определения мишеней. Лимфоцит может представлять собой Т-клетку, В-клетку, или НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека представляет собой библиотеку антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность рМНС мультимеров, как описано здесь. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность sc-рМНС, как описано здесь. Пара лимфоцит-пептид может представлять собой пару TCR-антиген. Пара лимфоцит-пептид может представлять собой пару BCR-антиген. В некоторых вариантах осуществления пептид совокупности пептидов включает идентификатор, как описано здесь. Компартмент может представлять собой отдельное пространство, например лунку, планшет, разделенную границу, фазовый сдвиг, сосуд, везикулу, клетку и так далее.

[0135] Описанные здесь способы и композиции могут применяться для идентификации пары лимфоцит-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ идентификации пары лимфоцит-пептид включает контактирование совокупности лимфоцитов с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 10, более 100, более 500, более 1000, более 2,000, более 5,000, более 10,000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов; компартментализацию лимфоцита совокупности лимфоцитов, связанного с пептидом пептидной библиотеки, в одном компартменте, при этом пептид включает уникальный пептидный идентификатор; и определение уникального пептидного идентификатора для каждого пептида, связанного с компартментализованным лимфоцитом. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека применяется для оценки пептидной библиотеки в плане идентификации пар лимфоцит-пептид после *de novo* определения мишеней. Лимфоцит может представлять собой Т-клетку, В-клетку, или НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека представляет собой библиотеку антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность рМНС мультимеров, как описано здесь. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность sc-рМНС, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления

пептид совокупности пептидов включает идентификатор, как описано здесь. Пара лимфоцит-пептид может представлять собой пару TCR-антиген. Пара лимфоцит-пептид может представлять собой пару BCR-антиген.

[0136] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы могут применяться для идентификации совокупности пептидов, лигандов, агонистов, антагонистов, антигенов или эпитопов, которые связываются с рецептором, иммунным рецептором, TCR, BCR, или антителом. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы могут применяться для идентификации совокупности рецепторов, иммунных рецепторов, TCR, BCR, или антител, которые связываются с пептидом. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы могут применяться для идентификации совокупности рецепторов, иммунных рецепторов, TCR, BCR, или антител, которые связываются с совокупностью пептидов, лигандов, агонистов, антагонистов, антигенов или эпитопов (например совокупности TCR, которые связываются с антигенами библиотеки патогенов (Фиг.8), раковой библиотекой или аутоиммунной библиотекой).

[0137] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации специфичности рецептор-лиганд. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации специфичности рецептор-агонист. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации специфичности рецептор-антагонист. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации специфичности иммунный рецептор-антиген (например специфичности TCR-антиген, специфичности BCR-антиген). В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации специфичности антитело-антиген.

[0138] В некоторых вариантах осуществления идентичность рецептора, иммунного рецептора, TCR, BCR, или антитела по изобретению определяется путем секвенирования (например секвенирования переменного, гиперпеременного участка или определяющего комплементарность участка (CDR) TCR, BCR или антитела). В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR1, CDR2 или CDR3 идентифицируют для альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, тяжелой цепи антитела или легкой цепи антитела.

[0139] В некоторых вариантах осуществления идентичность пептида, лиганда, агониста, антагониста, антигена или эпитопа определяют путем секвенирования (например путем использования идентификатора, как описано здесь).

[0140] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации пептидов, антигенов или эпитопов, которые связывают TCR. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для определения того, как мутации в идентифицированном пептиде, антигене или эпитопе влияют на связывание TCR (**Фиг.10**). В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации мутаций в идентифицированном пептиде, антигене или эпитопе, которые приводят к повышению или снижению аффинности связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации мутаций в идентифицированном пептиде, антигене или эпитопе, которые сохраняют аффинность связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации мутаций в идентифицированном пептиде, антигене или эпитопе, которые приводят к потере аффинности связывания TCR.

[0141] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для определения того, как мутации в рецепторе, иммунном рецепторе, TCR, BCR или антителе, идентифицированном с помощью описанных здесь способов, изменяют связывание пептида, лиганда, агониста, антагониста, антигена или эпитопа. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации мутаций в идентифицированном рецепторе, иммунном рецепторе TCR, BCR или антителе, которые приводят к сниженной или повышенной аффинности связывания пептида, лиганда, агониста, антагониста, антигена или эпитопа. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы могут применяться для идентификации мутаций в идентифицированном рецепторе, иммунном рецепторе TCR, BCR или антителе, которые сохраняют связывание пептида, лиганда, агониста, антагониста, антигена или эпитопа. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы могут применяться для идентификации мутаций в идентифицированном рецепторе, иммунном рецепторе TCR, BCR или антителе, которые приводят к потере связывания пептида, лиганда, агониста, антагониста, антигена или эпитопа.

[0142] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы могут применяться для идентификации TCR среди совокупности разнообразных TCR,

которые связываются с определенным пептидом, антигеном или эпитопом пептидной библиотеки. Идентифицированные TCR затем могут быть подвергнуты сравнению с идентифицированными TCR из образцов от разных субъектов или разных образцов от одного субъекта (например образцов различных тканей).

[0143] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь способы реализуют на Т-клетках совокупности субъектов. В некоторых вариантах осуществления анализ данных от нескольких субъектов обеспечивает возможность идентификации антигенов, распознаваемых несколькими субъектами. В некоторых вариантах осуществления анализ данных от нескольких субъектов обеспечивает возможность идентификации антигенов, распознаваемых несколькими клонотипами TCR. В некоторых вариантах осуществления анализ данных от нескольких субъектов обеспечивает возможность идентификации антигенов, распознаваемых несколькими пациентами, например несколькими пациентами с раком, несколькими пациентами с аутоиммунным состоянием, или несколькими пациентами с защитным иммунитетом против патогена. В некоторых вариантах осуществления анализ данных от нескольких субъектов обеспечивает возможность идентификации антигенов, распознаваемых у субъектов, включающих различные типы HLA или аллели. В некоторых вариантах осуществления анализ данных от нескольких субъектов обеспечивает возможность идентификации отдельных последовательностей гипервариабельных или определяющих комплементарность участков, которые демонстрируют конвергентное связывание антигенов.

[0144] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь способы реализуют с использованием совокупности библиотек. В некоторых вариантах осуществления анализ данных от нескольких субъектов обеспечивает возможность идентификации общих реактивных антигенов библиотек, например антигенов, демонстрирующих аффинность TCR, которые присутствуют в нескольких видах патогена, при нескольких видах рака, у нескольких пациентов с раком, при нескольких аутоиммунных заболеваниях, или при нескольких аутоиммунных состояниях. В некоторых вариантах осуществления анализ данных от нескольких библиотек обеспечивает возможность идентификации отдельных реактивных антигенов среди библиотек, например антигенов, присутствующих в рамках подмножества видов патогена, рака, состояний, или пациентов.

[0145] В некоторых вариантах осуществления клетки, проанализированные с помощью пептидной библиотеки по изобретению, подвергают анализу экспрессии генов (например секвенированию РНК, кПЦР). В некоторых вариантах осуществления анализ экспрессии генов выполняют на клетках, идентифицированных в качестве имеющих рецептор,

демонстрирующий специфичность в отношении пептида библиотеки по изобретению (Фиг.11). Например, клетки, которые, как определено, экспрессируют TCR, которые связываются с антигенами библиотеки патогенов, раковой библиотеки, или аутоиммунной библиотеки, подвергают анализу экспрессии генов. Анализ экспрессии генов может являться глобальным или прицельным. Гены, экспрессия которых подвергается анализу, включают, но без ограничения, гены с известными функциями; гены, кодирующие иммунные эффекторные молекулы (например перфорин, гранзим, цитокины, хемокины); иммунные молекулы контрольных точек; провоспалительные молекулы; противовоспалительные молекулы; маркеры происхождения; интегрины; селектины; маркеры памяти лимфоцитов; рецепторы смерти; каспазы; молекулы контрольной точки клеточного цикла; ферменты; фосфатазы; киназы; липазы; и метаболические гены. В некоторых вариантах осуществления анализ экспрессии генов может быть проведен одновременно со скринингом пептидной библиотеки. В некоторых вариантах осуществления анализ экспрессии генов может быть проведен после анализа результатов скрининга пептидной библиотеки. В некоторых вариантах осуществления анализ экспрессии генов может быть проведен до анализа результатов скрининга пептидной библиотеки. В некоторых вариантах осуществления анализ экспрессии генов обеспечивает возможность иммунотипирования клеток, идентифицированных в качестве представляющих интерес, из пар пептид-рецептор, полученных с помощью описанных здесь способов.

[0146] В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека может быть подвергнута скринингу на предмет функционального свойства. Например, пептидная библиотека, включающая совокупность пептидов, при этом совокупность пептидов включает более 10, более 100, более 500, более 1000, более 2000, более 5000, более 10000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов, может быть подвергнута скринингу в рамках функционального анализа. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека применяется для оценки пептидной библиотеки на предмет функционального свойства или дополнительного функционального свойства после первоначального функционального скрининга. Например, пептидная библиотека может приводиться в контакт с образцом и затем подвергаться тестированию на индуцирование функционального свойства. Подмножество пептидной библиотеки может быть определено на основе способности пептида индуцировать функциональное свойство. Образец может представлять собой биологический образец. Образец может представлять собой клеточный образец. Образец может представлять собой Т-клеточный образец.

Образец может быть получен от субъекта. Образец может представлять собой млекопитающее. Субъект может представлять собой человека.

[0147] Описанные здесь способы и композиции могут применяться для скрининговых анализов. Например пептидная библиотека может включать совокупность рМНС мультимеров, как описано здесь, которые приводят в контакт с Т-клеточным образцом. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека может включать совокупность sc-рМНС, как описано здесь, которые приводят в контакт с Т-клеточным образцом. После контактирования может быть определена пролиферация Т-клетки, цитотоксичность Т-клетки, супрессия Т-клетки, опосредованная Т-клеткой супрессия, или продуцирование Т-клеткой цитокинов для рМНС мультимера или sc-рМНС пептидной библиотеки (**Фиг.13**). рМНС мультимеры или sc-рМНС, которые могут индуцировать функциональное свойство, затем могут быть сформированы в виде подмножества пептидной библиотеки. Например, подмножество пептидной библиотеки может включать рМНС мультимеры или sc-рМНС, которые индуцируют пролиферацию Т-клетки при связывании с TCR, цитотоксичность при связывании с TCR, супрессию Т-клетки при связывании с TCR, опосредованную Т-клеткой супрессию при связывании с TCR, продуцирование цитокинов при связывании с TCR, или любую их комбинацию. Пролиферация может быть определена, например, с помощью анализа на основе разбавления и окрашивания (например анализа CFSE на основе разбавления) или количественного анализа репликации ДНК (например с помощью анализа на основе встраивания BrdU). Цитотоксичность может быть определена, например, с помощью анализов, которые основаны на высвобождении внутриклеточного фермента мертвыми клетками (например лактатдегидрогеназы), эксклюзионных анализов на основе окрашивания (например иодидом пропидия), или путем экспрессии цитолитических маркеров (например гранзима, CD107a) с помощью проточной цитометрии или кПЦР. Продуцирование цитокинов может быть определено, например, с помощью ELISA, мультиплексного иммуноанализа, внутриклеточного окрашивания цитокинов, ELISPOT, вестерн-блота или кПЦР. Супрессия Т-клетки может быть определена, например, с помощью совместного инкубирования клона Т-клетки с эффекторными клетками и антигеном-мишенью и измерения пролиферации, цитотоксичности, продуцирования цитокинов, экспрессии маркеров активации и так далее.

[0148] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь пептидные библиотеки могут применяться для выделения пар рецептор-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ выделения пар рецептор-пептид включает контактирование

совокупности рецепторов с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 10, более 100, более 500, более 1000, более 2,000, более 5,000, более 10,000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов; и получение совокупности компартментов, при этом компартмент совокупности включает рецептор совокупности рецепторов, связанный с пептидом пептидной библиотеки, что обеспечивает выделение пары рецептор-пептид в компартменте. Рецептор совокупности рецепторов может представлять собой, например, TCR, BCR, рецепторную тирозинкиназу (RTK), связанный с G-белком рецептор (GPCR), лиганд-управляемый ионный канал, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, или рецептор фактора роста, и так далее. В некоторых вариантах осуществления рецептор может являться растворимым. В некоторых вариантах осуществления рецептор может быть связан с поверхностью. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека представляет собой библиотеку антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность рМНС мультимеров, как описано здесь. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность sc-рМНС, как описано здесь. Пара рецептор-пептид может представлять собой пару TCR-антиген. Пара рецептор-пептид может представлять собой пару BCR-антиген. В некоторых вариантах осуществления пептид совокупности пептидов включает идентификатор, как описано здесь. Компартмент может представлять собой отдельное пространство, например лунку, планшет, разделенную границу, фазовый сдвиг, сосуд, везикулу, клетку и так далее.

[0149] Описанные здесь способы и композиции могут применяться для идентификации пары рецептор-пептид. В некоторых вариантах осуществления способ идентификации пары рецептор-пептид включает контактирование совокупности рецепторов с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 10, более 100, более 500, более 1000, более 2,000, более 5,000, более 10,000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов; компартментализацию рецептора совокупности рецепторов, связанного с пептидом пептидной библиотеки, в одном компартменте, при этом пептид включает уникальный пептидный идентификатор; и определение уникального пептидного идентификатора для каждого пептида, связанного с компартментализованным рецептором. Рецептор совокупности рецепторов может представлять собой, например, TCR, BCR, рецепторную тирозинкиназу (RTK), связанный с G-белком рецептор (GPCR), лиганд-управляемый ионный канал, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, или рецептор фактора роста, и так далее. В некоторых вариантах осуществления рецептор

может являться растворимым. В некоторых вариантах осуществления рецептор может быть связан с поверхностью. В некоторых вариантах осуществления пептидная библиотека представляет собой библиотеку антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность антигенов. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность рМНС мультимеров, как описано здесь. Совокупность пептидов может представлять собой совокупность sc-рМНС, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления пептид совокупности пептидов включает идентификатор, как описано здесь. Пара рецептор-пептид может представлять собой пару TCR-антиген. Пара рецептор-пептид может представлять собой пару BCR-антиген.

[0150] В рамках изобретения предусмотрены композиции и способы для идентификации пар между, например, пептидами и клетками, пептидами и рецепторами, пептидами и иммунными рецепторами, пептидами и TCR, пептидами и BCR, пептидами и антителами, лигандами и клетками, лигандами и рецепторами, лигандами и иммунными рецепторами, лигандами и TCR, лигандами и BCR, лигандами и антителами, агонистами и клетками, агонистами и рецепторами, агонистами и иммунными рецепторами, агонистами и TCR, агонистами и BCR, агонистами и антителами, антагонистами и клетками, антагонистами и рецепторами, антагонистами и иммунными рецепторами, антагонистами и TCR, антагонистами и BCR, антагонистами и антителами, антигенами и клетками, антигенами и рецепторами, антигенами и иммунными рецепторами, антигенами и TCR, антигенами и BCR, антигенами и антителами, эпитопами и клетками, эпитопами и рецепторами, эпитопами и иммунными рецепторами, эпитопами и TCR, эпитопами и BCR, и эпитопами и антителами. Пары могут быть идентифицированы у различных субъектов (кросс-секционным образом), у одного субъекта в различные моменты времени (в течение длительного времени), или с помощью обоих способов. Идентифицированные пептиды, рецепторы или пары могут быть связаны, например, с состоянием здоровья, заболеванием, заболеванием на ранней стадии, заболеванием на средней стадии, заболеванием на продвинутой стадии, прогрессирующим заболеванием, ответом на лечение, ремиссией, защитным иммунитетом, аутоиммунитетом, и так далее. В некоторых вариантах осуществления недостаток пептида или недостаток специфичности рецептора связан, например, с состоянием здоровья, заболеванием, заболеванием на ранней стадии, заболеванием на средней стадии, заболеванием на продвинутой стадии, прогрессирующим заболеванием, ответом на лечение, ремиссией, защитным иммунитетом, аутоиммунитетом, и так далее.

[0151] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации антиген-специфических Т-клеточных эффекторных клонов, связанных с защитным иммунитетом, незащитным иммунитетом или аутоиммунитетом. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации антиген-специфических Т-клеточных эффекторных клонов, которые демонстрируют анергические, связанные с истощением, толерогенные свойства, аутоиммунные свойства, воспалительные свойства, или противовоспалительные свойства (например регуляторных Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации антиген-специфических Т-клеточных эффекторных клонов, которые демонстрируют определенные эффекторные или связанные с памятью свойства (например наивные, терминальные эффекторные, эффекторные связанные с памятью, связанные с центральной памятью, связанные с резидентной памятью, T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_H9 , T_C1 , T_C2 , T_C17 , связанные с продуцированием определенных цитокинов).

[0152] В некоторых вариантах осуществления TCR, BCR или антитело, идентифицированное с помощью описанных здесь композиций и способов, применяется в качестве части терапевтического вмешательства. Например, последовательность TCR, последовательность вариабельного участка TCR, или последовательность CDR трансфицируется и трансдуцируется в Т-клетки для получения Т-клеток с одинаковой специфичностью. Т-клетки могут быть размножены, подвергнуты поляризации с получением требуемого эффекторного фенотипа (например T_H1 , T_C1 , регуляторных Т-клеток), и инфузирваны пациенту. В некоторых вариантах осуществления несколько TCR, BCR или антител, идентифицированных с помощью описанных здесь композиций и способов, применяются в рамках олигоклональной терапии.

[0153] В некоторых вариантах осуществления пептид, лиганд, агонист, антагонист, антиген или эпитоп, идентифицированный с помощью описанных здесь способов, применяется в качестве части терапевтического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления пептид, антиген или эпитоп применяется для размножения популяции клеток *ex vivo*, например с использованием антигенпрезентирующих клеток, искусственных антигенпрезентирующих клеток, иммобилизованного пептида или растворимого пептида. В некоторых вариантах осуществления размноженные клетки инфузируют пациенту. В некоторых вариантах осуществления размножают лимфоциты периферической крови. В некоторых вариантах осуществления размножают опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL). В некоторых вариантах осуществления размножают

T_H1 клетки. В некоторых вариантах осуществления размножают цитотоксические Т-лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления размножают регуляторные Т-клетки.

[0154] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для идентификации антигенов для использования при разработке вакцины, например субъединичной вакцины, обеспечивающей охват против ряда защищенных антигенов вакцины, или универсальной вакцины.

[0155] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы могут применяться для диагностики медицинского состояния. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь композиции и способы применяются для вынесения клинического решения, например выбора лечения, идентификации прогностических факторов, отслеживания реакции на лечение или прогрессирования заболевания, или реализации превентивных мер.

[0156] Композиции и способы по изобретению могут включать носители для захвата. в некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению обратимо или необратимо связана с носителем для захвата. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть химически связана с носителем для захвата. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть ковалентно связана с носителем для захвата. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть нековалентно связана с носителем для захвата. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть связана с носителем для захвата с помощью взаимодействий на основе заряда, например ионных связей. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть связана с носителем для захвата с помощью водородных связей. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть связана с носителем для захвата с помощью полярных связей. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть связана с носителем для захвата с помощью взаимодействий биотин-стрептавидин или биотин-авидин. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть условно высвобождена от носителя для захвата, например путем химической обработки и ферментативной обработки.

[0157] В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может представлять собой твердую поверхность. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать матрицу. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата

может включать наночастицу. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать шарик. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать магнитный шарик. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать гидрогель. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может представлять собой внутреннюю поверхность воды в капле масляной эмульсии. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать белок. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать антитело или его производное. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать гель. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может включать полимер. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может иметь заряд. В некоторых вариантах осуществления носитель для захвата может быть флуоресцентным, например меченным флуоресцентным красителем или красителями.

[0158] В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть отщеплена от носителя для захвата с помощью ферментативного расщепления. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть отщеплена от носителя для захвата с помощью расщепления рестрикционным ферментом. В некоторых вариантах осуществления пептид или нуклеиновая кислота по изобретению может быть отщеплена от носителя для захвата с помощью химической обработки или расщепления.

ПРИМЕРЫ

[0159] Указанные далее примеры приведены для дополнительного описания некоторых аспектов настоящего изобретения и не должны рассматриваться в качестве ограничивающих объем изобретения.

Пример 1: Конструирование объективного 9-мерного пептида

[0160] В данном примере демонстрируется идентификация библиотеки 9-мерных пептидов, включающей полное химическое пространство для пептида определенной длины.

[0161] Данный пример отражает отход от предшествующих попыток, при которых пептидные библиотеки были ограничены знанием представляющих интерес мишеней. Данные библиотеки конструировали на основе знаний о физическом взаимодействии, характеристиках мишени/партнера, связанных с получением ограничений, или других параметрах, которые делали необъективным объем библиотеки. Таким образом,

библиотеки были представлены в крайне необъективном виде. Библиотека в данном примере была сконструирована для включения всех 9-мерных пептидов, которые являлись возможными на основе 20 аминокислот, кодируемых генетическим кодом.

[0162] Библиотека была сконструирована для включения всех комбинаций последовательности 9-меров на основе 20 известных аминокислот, например 5×10^{11} уникальных пептидных последовательностей.

Пример 2: Анализ химического пространства HLA-A2 необъективных 9-мерных пептидов

[0163] В данном примере демонстрируется идентификация библиотеки 9-мерных пептидов, включающей полное химическое пространство для антигенов определенной длины, которые являлись специфическими в плане взаимодействия с белками главного комплекса гистосовместимости, например HLA-A2.

[0164] Как и в примере 1, данная пептидная библиотека не была ограничена на основе знания представляющих интерес мишеней или взаимодействующих антигенов. HLA-A2 имеет хорошо понимаемый мотив связывания с аминокислотными последовательностями в положениях 2 и 9, которые могут включать I, V, или L. Данная библиотека была сконструирована для включения всех 9-мерных пептидов, которые имеют любую из данных последовательностей в обоих указанных положениях. Полученная библиотека представляла собой подмножество 9-мерной библиотеки, описанной в примере 1, поскольку данная библиотека ограничивала вариабельность 9-меров в положениях 2 и 9.

[0165] Библиотека была сконструирована для включения всех комбинаций последовательности 9-меров на основе 20 известных аминокислот с ограничениями в положениях 2 и 9. В качестве рестриктированных по HLA-A2 всего было идентифицировано 1×10^{11} уникальных 9-мерных пептидных последовательностей. Такие же рестрикции являются аналогичными для других комплексов МНС.

Пример 3: Библиотека 9-мерных пептидов вирома человека

[0166] В данном примере демонстрируется идентификация библиотеки 9-мерных пептидов, включающей полное химическое пространство для вирусных антигенов человека данной конкретной длины.

[0167] Вирусы, выбранные для включения в пептидную библиотеку, представляли собой отобранные вирусные протеомы человека в качестве хозяина, как указано в доступной онлайн базе данных Uniprot, с добавлением идентификаторов таксонов для видов, идентифицированных с помощью программного поиска протеомов Uniprot. Полные и частичные протеомы скачивали на основе идентификатора протеомов из Uniprot с

помощью REST API. Покрывание протеомами для выбранных видов проверяли вручную. Затем библиотеку дополнительно увеличивали для включения всех протеомов из доступных ортоксантавирусов, а также дополнительного разнообразия вокруг высоковариабельных таксонов (ВИЧ и вируса гриппа).

[0168] В данную библиотеку включали каждый 9-мер из каждого белка в идентифицированных протеомах. Данная библиотека также представляла собой подмножество объективной библиотеки 9-меров, описанной в примере 1, поскольку данная библиотека ограничивала вариабельность 9-меров, получаемых из выбранного вирусного протеома человека.

[0169] Дополнительная библиотека была идентифицирована в виде 9-меров, рестриктированных по одному из белков комплекса МНС, как описано в примере 2. В качестве рестриктированных по HLA-A2 всего было идентифицировано $1,5 \times 10^5$ уникальных 9-мерных пептидов из 3×10^6 пептидов.

Пример 4: Библиотека 9-мерных пептидов цитомегаловируса

[0170] В данном примере демонстрируется идентификация библиотеки 9-мерных пептидов, покрывающей полный протеом цитомегаловируса (ЦМВ).

[0171] Данная библиотека была сконструирована для включения каждого 9-мера из каждого белка протеома ЦМВ. Полученная библиотека включала 7×10^4 уникальных 9-мерных пептидов. Данная библиотека также представляла собой подмножество вирусной библиотеки 9-меров человека, описанной в примере 3, поскольку данная библиотека ограничивала вариабельность 9-меров, получаемых из ЦМВ.

[0172] Дополнительная библиотека была идентифицирована в виде 9-меров, рестриктированных по одному из белков комплекса МНС, как описано в примере 2. В качестве рестриктированных по HLA-A2 всего было идентифицировано 4×10^3 уникальных 9-мерных пептидов из 7×10^4 пептидов.

Пример 5: Библиотека 9-мерных пептидов белка pp65 цитомегаловируса

[0173] В данном примере демонстрируется идентификация библиотеки 9-мерных пептидов, включающей полную последовательность белка pp65 цитомегаловируса (ЦМВ).

[0174] В данную библиотеку включали каждый 9-мер из белка pp65. Полученная библиотека включала 571 уникальный 9-мерный пептид. Она также представляла собой подмножество библиотеки 9-меров, описанной в примере 4, поскольку данные 9-меры были связаны с белком pp65.

[0175] Дополнительная библиотека была идентифицирована в виде 9-меров, рестриктированных по одному из белков комплекса МНС, как описано в примере 2. В

качестве рестриктированных по HLA-A2 всего было идентифицировано 26 уникальных 9-мерных пептидов из 571 пептида.

Пример 6: Эпитоп-специфическое позиционное мутационное сканирование для библиотеки 9-мерных пептидов

[0176] В данном примере демонстрируется идентификация библиотеки 9-мерных пептидов, включающей полное мутационное сканирование эпитопа.

[0177] Для эпитопа NLVPMVATV белка pp65 конструировали библиотеку 9-меров с единичными мутациями, как описано у Horpes, et al. in J Immunol, 2014, 193. Полученная библиотека включала 172 уникальных 9-мерных пептида. Она также представляла собой подмножество библиотеки 9-меров, описанной в примере 1, поскольку данные 9-меры включали позиционные мутации по всему 9-меру на основе NLVPMVATV.

[0178] Для эпитопа NLVPMVATV белка pp65 конструировали библиотеку 9-меров с двумя мутациями. Полученная библиотека включала 13168 уникальных 9-мерных пептидов.

[0179] Для эпитопа NLVPMVATV белка pp65 конструировали библиотеку 9-меров с тремя мутациями. Полученная библиотека включала 589324 уникальных 9-мерных пептидов.

[0180] Для эпитопа NLVPMVATV белка pp65 конструировали библиотеку 9-меров со всеми мутациями. Полученная библиотека включала $5,12 \times 10^{11}$ уникальных 9-мерных пептидов.

Пример 7: Получение библиотеки 9-мерных пептидов

[0181] Получали пептидные библиотеки, описанные в любом из предыдущих примеров, в соответствии с известными в данной области способами, или получали синтетическим образом с помощью коммерческого поставщика или с применением синтезатора пептидов в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 8: *In vitro* трансляция пептидной МНС библиотеки

[0182] В данном примере демонстрируется синтез белка без использования клеток (CFPS).

[0183] Синтез белка без использования клеток (CFPS) пептидной библиотеки обеспечивает возможность получения широкого ряда различных пептидов. Достижение высокого выхода при CFPS требует применения бактериальных систем, в которых первая аминокислота транслированной последовательности представляет собой N-формилметионин (fMet). Данный остаток отличается от метионина тем, что он содержит нейтральную формильную группу (HCO) вместо положительно заряженного амино-конца (NH₃⁺). Таким образом, каждый вариант пептидной библиотеки будет содержать fMet. Однако архитектура связывающей пептид бороздки молекул МНС класса I

сконструирована для специфичного соответствия только положительно заряженному аминоконцу любого пептида и не будет правильным образом включать пептид, который имеет последовательность, начинающуюся с fMet. Безуспешная загрузка пептида будет влиять на фолдинг и будет приводить к образованию подвергнутого неправильным образом фолдингу нефункционального МНС, поскольку оба процесса являются взаимосвязанными. Несмотря на то, что бактерии могут использовать эндогенные аминопептидазы для расщепления fMet, его удаление может являться либо неполным, либо быть пропущено, в зависимости от идентичности второй аминокислоты в последовательности. Например, метионинаминопептидаза между fMet и аспарагином устраняется неэффективным образом. В результате этого производный от ЦМВ пептид, представляющий собой модель пептида в данной системе, будет в итоге получен как fMet-NLVPMVATV в виде одной цепи; вся молекула не будет подвергаться фолдингу правильным образом и не будет связываться с родственным ей Т-клеточным рецептором. Данный результат является ожидаемым, если белок будет получен в бактериальной CFPS системе, которая получена из неочищенного клеточного экстракта. Более того, в контексте библиотеки одна отдельная матрица может приводить к получению пептидов с/без fMet или их смеси, если процессинг является неэффективным. В рамках восстановленной CFPS системы, которая состоит только из очищенных компонентов и полностью лишена метионинаминопептидаз, все варианты библиотеки могут начинаться с fMet остатка.

[0184] Для решения данной проблемы были сконструированы конструкторы для включения генов, кодирующих домен ферментативного расщепления и полипептид библиотеки. Удаление, по меньшей мере, начальной метиониновой аминокислоты обеспечивало успешный фолдинг пептида и загрузку на МНС белок. Более того, удаление начальной метиониновой аминокислоты повышало верхний предел разнообразия пептидной библиотеки, например в виде 20^x , где x представляет собой длину пептида, в то время как включение данного остатка будет ограничивать разнообразие библиотеки в виде $20^{(x-1)}$.

[0185] В данном примере пептиды синтезировали при условиях без использования клеток. Все CFPS компоненты подвергали оттаиванию и смешивали на льду и затем переносили в соответствующую температуру для инициирования реакции. Добавляли реагенты: 40% (об./об.) раствора A PURExpress, 30% (об./об.) раствора B PURExpress (E6800L, New England Biolabs, Inc.), 0,8 МЕ/мкл реакции ингибитора РНКазы (10777019, ThermoFischer Scientific), 4% (об./об.) каждого из дисульфидных энхансеров 1 и 2 (E6820L, New England Biolabs, Inc.), 0,004 МЕ/мкл реакции протеазы, разбавленной в PBS (Invitrogen), воду без нуклеаз и 20 нг/мкл соответствующей плазмидной ДНК, кодирующей требуемый CFPS

продукт. Тестировали четыре различные температуры CFPS: 20, 25, 30 и 37°C. В каждый из указанных моментов времени образцы брали и останавливали реакцию путем размещения пробирок на льду и добавления ЭДТА до конечной концентрации 2 мМ.

[0186] На **Фиг.2А** показано ферментативное расщепление для повышения разнообразия пептидов. Пары дорожек 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 и 9-10 обозначают CFPS реакции, осуществленные в рамках матрицы без расщепляемого фрагмента, матрицы с расщепляемым фрагментом без добавления протеазы, матрицы с расщепляемым фрагментом с добавлением протеазы после завершения реакции, матрицы с расщепляемым фрагментом, в которой протеаза присутствовала во время реакции, и реакцию без матрицы, соответственно. Образцы в рамках дорожек с нечетными номерами подготавливали для гель-электрофореза при восстанавливающих условиях с добавлением 100 мМ ДТТ. Все реакции останавливали путем размещения пробирок на льду спустя 4 часа при комнатной температуре. В образцы 3-8 добавляли 4 МЕ/реакция протеазы. В реакции на дорожках 5-6 после размещения пробирки на льду добавляли протеазу наряду с 10 мМ ЭДТА и затем трансфицировали при комнатной температуре в течение дополнительных 3,5 часов перед повторным размещением на льду.

[0187] Для определения общего выхода белка применяли вестерн-блоттинг. Каждый CFPS образец смешивали с водой, 4х буфером для образцов и 1М ДТТ, кипятили при 95 °С в течение 5 минут и затем наносили на 10% SDS-PAGE гель. Затем образцы подвергали блоттингу с использованием HRP антитела против FLAG.

[0188] На **Фиг.2В** показаны образцы в рамках CFPS реакции, которые содержали мультимерные и мономерные матрицы с/без расщепляемого фрагмента. Образцы подвергали блоттингу и осуществляли детектирование с использованием HRP антитела против FLAG. Реакции останавливали путем размещения пробирок на льду спустя 4 часа при комнатной температуре.

Пример 9: Анализ 3-D структуры in vitro транслированного белка

[0189] В данном примере демонстрируется CFPS белок, подвергнутый фолдингу с образованием узнаваемой 3-мерной структуры.

[0190] В данном примере CFPS белок, полученный в рамках примера 8, тестировали на конформационное распознавание с помощью антитела. Белки, которые являются подвергнутыми фолдингу неправильным образом или не подвергнутыми фолдингу, не распознаются антителом. В описанном далее примере демонстрируется, что CFPS белок был подвергнут фолдингу и конформационно распознавался антителом после расщепления домена ферментативного расщепления.

[0191] Экспрессию белка измеряли с помощью ELISA. Планшеты покрывали антителом против стрептавидина (410501, Biolegend), разбавленным в 100 мМ бикарбонатном/карбонатном буфере для покрытия, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшеты промывали три раза путем наполнения лунок промывочным буфером (PBS с добавлением 0,05% твин-20) и блокировали в течение 2 часов при комнатной температуре путем наполнения лунок блокирующим буфером (промывочный буфер с добавлением 2% (об./об.) BSA). Затем лунки наполняли с помощью последовательных разведений каждого CFPS белка в блокирующем буфере с последующим инкубированием в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали три раза промывочным буфером и инкубировали с 0,15 мкг/мл антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, являющихся специфичными в отношении белка, разбавленного в блокирующем буфере в течение 1 часа при комнатной температуре.

[0192] После трех дополнительных промываний появлялось окрашивание за счет добавления 3,3',5,5' тетраметилбензидинового субстрата в каждую лунку, при этом реакцию останавливали путем добавления коммерческого раствора для остановки реакции. С помощью сканера для планшетов измеряли поглощение при 450 нм. Значения представляли собой усредненные удвоенные значения. Планшеты покрывали адгезивным пластиком и осторожно встряхивали на ротаторе при каждом инкубировании. Концентрацию каждого образца интерполировали на основе стандартной кривой белка в виде положительного контроля.

[0193] На **Фиг.2С** показано, что пептиды, полученные с помощью CFPS и подвергнутые протеолитическому расщеплению, подвергались фолдингу с образованием узнаваемой 3-мерной структуры. Для детектирования линейных эпитопов или конформационного эпитопа применяли ELISA и вычисляли процентную долю подвергнутого правильным образом фолдингу белка. В обе CFPS реакции добавляли протеазу. Фигура показывает, демонстрировал ли расщепленный протеазой пептид или нерасщепленный (содержащий fMet) пептид правильный фолдинг на основе распознавания антителом конформационного эпитопа.

[0194] На **Фиг.2D** показано связывание мультимера одноцепочечный пептид-МНС (sc-pMHC) с антиген-специфическими Т-клетками. Мультимеры получали с помощью CFPS и расщепления ферментом. Т-клетки инкубировали с мультимерами, затем окрашивали флуоресцентным антителом для детектирования и анализировали с помощью проточной цитометрии. Для FACS окрашивания применяли обогащенные ЦМВ Т-клетки (донор 153, Astarte 3835FE18, кат. # 1049). Лунки 96-луночного микротитровального планшета с

круглым дном наполняли Т-клетками, при этом клетки промывали один раз ледяным FACS буфером (D-PBS, 2 mM ЭДТА и 2% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки), центрифугировали при 300 г и 4 °С, и затем удаляли супернатант. Затем соответствующие лунки блокировали раствором для блокирования Fc рецепторов в течение 30 минут при 4 °С при осторожном встряхивании, промывали FACS буфером и удаляли супернатант. В компенсационные контрольные лунки добавляли FACS буфер.

[0195] На следующем этапе клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °С с 20 нМ положительным контролем или с разбавлениями образцов, взятых в рамках указанных CFPS реакций в примере 8, и затем промывали один раз FACS буфером. В каждую лунку добавляли 100 нМ антитела для детектирования, разбавленного в FACS буфере, и планшет инкубировали при 4 °С в течение 30 минут в темноте и далее два раза промывали PBS и окрашивали с помощью фиксируемого красителя жизнеспособности APC-eFluor780 (1:8000 разбавления, 50 мкл/лунка) в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем планшет дважды промывали FACS буфером и фиксировали фиксирующим буфером PBS, 3,7% формальдегидом (об./об.), 2% FBS (об./об.)). Наконец, образцы переносили в FACS пробирки для анализа.

Пример 10: Получение пептидной библиотеки в клетках млекопитающих

[0196] Пептиды получали с помощью синтеза белков без использования клеток, как описано в примере 8, в клетках млекопитающих или синтетически, как описано в примере 7.

[0197] Для экспрессии в млекопитающих конструировали конструктор, кодирующий ЦМВ пептид с С-концевой FLAG-меткой с/без С-концевой His-метки в векторе экспрессии млекопитающих. Пептиды экспрессировали путем временной трансфекции в клетки Expi293F или ExpiCHO-S (Life Technologies) в соответствии с рекомендациями производителя.

[0198] Пептиды очищали из супернатантов клеточных культур с помощью анти-Flag аффинной хроматографии (Genscript) или Ni-аффинной хроматографии. Эксклюзионную хроматографию (SEC) осуществляли на гидрофильной смоле (GE Life Sciences), предварительно уравновешенной в 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2.

[0199] В качестве альтернативы пептиды очищали с помощью Ni-аффинной хроматографии без SEC очистки с применением колоночного буфера в виде 23 mM фосфата натрия, 500 mM хлорида натрия, 500 mM имидазола, pH 7,4.

[0200] Пептиды, полученные в клетках млекопитающих, подвергали количественному анализу с помощью УФ-излучения при 280 нм, в то время как полученные с помощью

CFPS пептиды подвергали количественному анализу с помощью сэндвич-ELISA относительно стандартного белка.

Пример 11: Присоединение пептидного идентификатора к пептидной библиотеке

[0201] В данном примере демонстрируется мечение пептидной библиотеки пептидным идентификатором.

[0202] ЦМВ пептиды получали синтетически, как в примере 7, с помощью синтеза белков без использования клеток, как описано в примере 8, или в клетках млекопитающих, как описано в примере 10.

[0203] Пептиды, которые были получены как описано здесь, метили одним или несколькими пептидными идентификаторами (например фрагментами ДНК). Каждый пептидный идентификатор был синтезирован либо коммерческим образом (Integrated DNA Technologies) или с помощью ПЦР амплификации. Мечение достигалось путем смешивания 50% об./об. пептида и 50% об./об. пептидного идентификатора и подтверждалось на основе сдвига вверх на вестерн-блоте.

[0204] На **Фиг.3** показан вестерн-блот ЦМВ пептида с одним или несколькими пептидными идентификаторами. Нижняя стрелка обозначает голый пептид. Средняя стрелка обозначает пептид с одним пептидным идентификатором. Верхняя стрелка обозначает пептид с двумя пептидным идентификаторами.

Пример 12: Библиотека 9-мерных HLA-A2 пептидов

[0205] В данном примере демонстрируется возможность получать библиотеку 9-мерных пептидов, включающую полное химическое пространство для длины антигена, являющегося специфическим для HLA-A2.

[0206] Это является отходом от предшествующих попыток, при которых определенные представляющие интерес мишени были идентифицированы путем физического взаимодействия и затем презентировались крайне необъективным образом. HLA-A2 имеет хорошо понимаемый мотив связывания с ключевыми аминокислотами в положениях 2 и 9, которые могут включать I, V, или L. Библиотека в данном примере сконструирована лишь для включения всех 9-мерных пептидов, которые имеют эти последовательности в обоих указанных положениях, образуя 1×10^{10} пептидов.

[0207] Конструкты сконструированы для включения генов, кодирующих домен ферментативного расщепления и один из 1×10^{10} уникальных 9-мерных пептидов.

[0208] Пептидная библиотека получена в соответствии с аналогичными способами, как описано в примере 8. Затем пептидная библиотека загружается на HLA-A2 молекулы для получения библиотеки пептидов/МНС (pMHC).

[0209] Полученная рМНС библиотека может применяться при скрининге Т-клеток для определения антиген-реактивных Т-клеток. См., например, Simon et al, Cancer Immunol Res, 2014, 2(12):1230-1244.

Пример 13: Пептидная библиотека, связывающаяся с клетками

[0210] В данном примере демонстрируется детектирование связывания пептидов с клетками.

[0211] Для тестирования функциональности пептидов, меченных пептидными идентификаторами, получали пептид-специфические (ЦМВ) и не являющиеся специфическими в плане пептидов (ВПЧ) Т-клетки (Astarte Biologics). Замороженные Т-клетки подвергали оттаиванию в соответствии с руководствами производителя. Клетки блокировали 20% об./об. раствором для блокирования Fc и 0,1 мг/мл спермой лосося в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки инкубировали с 10% об./об. мечеными пептидным идентификатором пептидами в FACS буфере (D-PBS, 2 mM ЭДТА и 2% (об./об.) FBS) в течение 30 минут при 4°C и промывали.

[0212] Клетки далее разделяли на две группы, при этом определяли связывание пептидов с помощью проточной цитометрии и детектировали идентификаторы с помощью кПЦР. Для детектирования на основе белка клетки инкубировали с антителом против Flag (Biolegend) 2% об./об. в течение 30 минут при 4°C и промывали. Наконец клетки фиксировали в фиксирующем буфере (D-PBS, 3,7% формальдегид и 2% FBS) и анализировали на проточном цитометре.

[0213] На **Фиг.4** показаны результаты связывания голого пептида, меченного пептидным идентификатором пептида, или отрицательного контроля для Т-клеток, являющихся или не являющихся специфичными в отношении пептида. Голый пептид и пептид, меченный пептидным идентификатором, демонстрировали связывание со специфичными в отношении пептидов Т-клетками в отличие от не являющихся специфичными в отношении пептидов Т-клетками.

[0214] Для детектирования на основе пептидного идентификатора клетки лизировали с помощью набора для лизиса клеток и стабилизации РНК (Life Technologies Corporation) и готовили мастер-микс кПЦР в соответствии с протоколом производителя. Значения C_t нормализовывали относительно внутреннего контроля с помощью праймеров, специфических для гена домашнего хозяйства (например Rpl13). Относительные значения сравнивали со значениями, полученными от Т-клеток без пептида с применением способа $\Delta\Delta C_t$.

[0215] На **Фиг.5** показано, что относительное количество меченого пептидным идентификатором пептида нормализовано относительно гена домашнего хозяйства. Специфические в отношении пептидов Т-клетки, инкубированные с меченым пептидным идентификатором пептидом, имели намного более интенсивный сигнал, чем неспецифические в отношении пептидов Т-клетки, инкубированные с меченым пептидным идентификатором пептидом, что свидетельствует об определенном взаимодействии между Т-клетками и пептидом. Кроме того, голый пептид практически не имел детектируемого сигнала как для специфических в отношении пептидов, так и неспецифических в отношении пептидов Т-клеток.

Пример 14: Идентификация профилей специфичности антигенов TCR

Библиотека 9-меров, включающая полные результаты мутационного сканирования NLVPMVATV эпитопа, сконструирована как описано в примере 6. sc-pMHC, включающие 9-меры, синтезируют как описано в примере 8, при этом идентификаторы присоединены как описано в примере 11. Библиотеку инкубируют с совокупностью Т-клеток, при этом Т-клетки сортируют в компартменты в виде одиночных клеток. Т-клетки лизируют и получают нуклеиновые кислоты из лизированных Т-клеток, включающие идентификаторы. Данные нуклеиновые кислоты объединяют и секвенируют. Идентификаторы в результатах сканирования обеспечивают возможность сравнения пептидных идентификаторов с последовательностями Т-клеток из того же компартмента. Профили специфичности антигенов TCR определяют путем идентификации TCR последовательности (например варибельного участка, гиперварибельного участка или CDR) из компартмента и количественного анализа результатов сканирования пептидных идентификаторов из того же компартмента (**Фиг.9А**). Идентифицируют мутации эпитопов в антигене идентифицированной пары TCR-антиген, которые приводят к повышенной или пониженной аффинности связывания TCR.

Пример 15: Идентификация TCR, которые связываются с антигенами-мишенями

[0216] Данные секвенирования получают как описано в примере 14. Для каждого подвергнутого секвенированию пептидного идентификатора идентифицируют соответствующие TCR последовательности (например варибельный участок, гиперварибельный участок, или CDR). Идентифицируют множество TCR, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении пептидов пептидной библиотеки, и идентифицируют множество пептидов, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении определенных TCR (**Фиг.9В**).

Пример 16: Конвергенция разнообразных TCR

[0217] Выполняли эксперименты с применением способов, описанных в примере 14 и примере 15. Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от различных субъектов. Идентифицируют TCR от различных субъектов, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении пептидов пептидной библиотеки (Фиг.9С).

Пример 17: Определение ЦМВ антигена и конструирование вакцин

[0218] В данном примере демонстрируется применение описанных здесь композиций и способов для определения определенных антигенов и последовательностей Т-клеточных рецепторов и последующая разработка вакцин и клеточной терапии.

[0219] В исследовании принимали участие субъекты, которым было назначено пройти трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). Кровь брали в день 0 и день 30 после HSCT. Т-клетки выделяли из крови и культивировали. Культивированные Т-клетки инкубировали с библиотекой sc-рМНС по изобретению (например библиотекой, включающей пептиды, полученные из ЦМВ геномов, транскриптомов, или протеомов с позиционным сканированием), при этом клетки сортировали в компартменты в виде одиночных клеток.

[0220] Т-клетки лизируют и получают нуклеиновые кислоты из лизированных Т-клеток, включающие идентификаторы. Данные нуклеиновые кислоты объединяют и секвенируют. Идентификаторы в результатах сканирования обеспечивают возможность сравнения пептидных идентификаторов с последовательностями Т-клеток из того же компартмента. Профили специфичности антигенов TCR определяют путем идентификации TCR последовательности (например варибельного участка, гиперварибельного участка или CDR) из компартмента и количественного анализа результатов сканирования пептидных идентификаторов из того же компартмента. Для каждого подвергнутого секвенированию пептидного идентификатора идентифицируют соответствующие TCR последовательности. Идентифицируют множество TCR, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении одного или нескольких пептидов пептидной библиотеки, и идентифицируют множество пептидов, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении одного или нескольких TCR. Субъектов классифицировали в виде сероположительных или серонегативных в плане ЦМВ и дополнительно классифицировали на основе контроля ЦМВ или реактивации. Сравнивали полученные от субъектов результаты. Идентифицировали пептиды и последовательности TCR, которые связаны с контролем ЦМВ, и использовали для разработки ЦМВ вакцин и клеточной терапии.

Пример 18: Вакцины и клеточная терапия на основе TCR для пациентов, не отвечающих на ингибиторы контрольных точек

[0221] В данном примере демонстрируется применение описанных здесь композиций и способов для определения определенных антигенов и последовательностей TCR, связанных с ответом на терапию ингибиторами контрольных точек, и последующая разработка вакцин и клеточной терапии.

[0222] В исследовании принимали участие субъекты, которым было назначено пройти лечение ингибиторами контрольных точек для лечения немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) или колоректального рака (CRC). От субъектов получали несколько биопсий перед введением ингибитора контрольных точек и после введения ингибитора контрольных точек и оставляли время для достижения терапевтического эффекта. Т-клетки выделяли из биопсии и культивировали. Культивированные Т-клетки инкубировали с библиотекой sc-pMHC по изобретению (например библиотекой, включающей пептиды, полученные из NSCLC/CRC геномов, транскриптомов, или протеомов), при этом клетки сортировали в компартменты в виде одиночных клеток.

[0223] Т-клетки лизируют и получают нуклеиновые кислоты из лизированных Т-клеток, включающие идентификаторы. Данные нуклеиновые кислоты объединяют и секвенируют. Идентификаторы в результатах сканирования обеспечивают возможность сравнения пептидных идентификаторов с последовательностями Т-клеток из того же компартмента. Профили специфичности антигенов TCR определяют путем идентификации TCR последовательности (например варибельного участка, гиперварибельного участка или CDR) из компартмента и количественного анализа результатов сканирования пептидных идентификаторов из того же компартмента. Для каждого подвергнутого секвенированию пептидного идентификатора идентифицировали соответствующие TCR последовательности. Идентифицируют множество TCR, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении одного или нескольких пептидов пептидной библиотеки, и идентифицируют множество пептидов, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении одного или нескольких TCR.

[0224] Субъекты могут отслеживаться длительное время, при этом анализы могут выполняться на биопсиях в течение двух или более циклов лечения ингибитором контрольных точек.

[0225] Субъектов классифицировали в качестве отвечающих или не отвечающих на лечение ингибитором контрольных точек. Сравнивали полученные от субъектов результаты. Идентифицировали пептиды и TCR последовательности, которые связаны с

успешным ответом на терапию ингибитором контрольных точек. Идентифицированные пептиды и последовательности TCR могут быть подтверждены во втором или последующем цикле лечения ингибитором контрольных точек или у последующих принимающих участие в исследовании субъектов. Идентифицированные пептиды и TCR последовательности применяются для разработки раковых вакцин и клеточной терапии.

Пример 19: Универсальная вакцина против гриппа

[0226] В данном примере демонстрируется применение описанных здесь композиций и способов для определения определенных антигенов и последовательностей TCR, связанных с иммунными ответами на штаммы гриппа, и последующая разработка вакцин, включая универсальную вакцину против гриппа.

[0227] Субъекты принимали участие для вакцинации или инфицирования различными штаммами гриппа. Субъектов инфицировали вирусом гриппа, вакцинировали живым ослабленным штаммом гриппа, или вакцинировали субъединичной вакциной против гриппа.

[0228] Получали образцы крови от субъектов в день -7 (перед инфицированием/вакцинацией), день 10 после инфицирования/вакцинации, и день 45 после инфицирования/вакцинации.

[0229] Т-клетки выделяли из образцов крови и культивировали. Культивированные Т-клетки инкубировали с библиотекой sc-рМНС по изобретению (например библиотекой, включающей пептиды, полученные из геномов, транскриптомов, или протеомов вируса гриппа с позиционным сканированием), при этом клетки сортировали в компартменты в виде одиночных клеток.

[0230] Т-клетки лизируют и получают нуклеиновые кислоты из лизированных Т-клеток, включающие идентификаторы. Данные нуклеиновые кислоты объединяют и секвенируют. Идентификаторы в результатах сканирования обеспечивают возможность сравнения пептидных идентификаторов с последовательностями Т-клеток из того же компартмента. Профили специфичности антигенов TCR определяют путем идентификации TCR последовательности (например варибельного участка, гиперварибельного участка или CDR) из компартмента и количественного анализа результатов сканирования пептидных идентификаторов из того же компартмента. Для каждого подвергнутого секвенированию пептидного идентификатора идентифицировали соответствующие TCR последовательности. Идентифицируют множество TCR, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении одного или нескольких пептидов пептидной библиотеки, и идентифицируют множество пептидов, которые демонстрируют

аффинность связывания в отношении одного или нескольких TCR. Анализ конвергенции пептид-МНС от различных субъектов, подвергнутых инфицированию/вакцинации, обеспечивает идентификацию защитных антигенов. Защитные антигены соединяют в виде вакцины для обеспечения широкой или универсальной защиты от нескольких штаммов вируса гриппа.

Пример 20: Терапия диабета на основе регуляторных Т-клеток

[0231] В данном примере демонстрируется применение описанных здесь композиций и способов для определения определенных антигенов и последовательностей TCR, связанных с аутоиммунитетом, и последующая разработка толерогенной клеточной терапии.

[0232] В рамках одной группы исследования использовались посмертные образцы тканей, собранные от субъектов с диабетом 0/1 стадии I типа (и сопоставленных здоровых контролей). Образцы тканей включали бета-островки, кровь, селезенку, лимфотический узел и костный мозг. В рамках второй группы исследования принимали участие живые субъекты с диабетом 0/1 стадии I типа (и сопоставленные здоровые контроли). Периодически получали образцы крови от субъектов.

[0233] Т-клетки выделяли из образцов крови и культивировали образцы тканей. Культивированные Т-клетки инкубировали с библиотекой sc-pMHC по изобретению (например библиотекой, включающей пептиды, полученные из геномов, транскриптомов, или протеомов здоровых или имеющих аутоиммунитет субъектов, представляющих собой людей), при этом клетки сортировали в компартменты в виде одиночных клеток.

[0234] Т-клетки лизируют и получают нуклеиновые кислоты из лизированных Т-клеток, включающие идентификаторы. Данные нуклеиновые кислоты объединяют и секвенируют. Идентификаторы в результатах сканирования обеспечивают возможность сравнения пептидных идентификаторов с последовательностями Т-клеток из того же компартмента. Профили специфичности антигенов TCR определяют путем идентификации TCR последовательности (например варибельного участка, гиперварибельного участка или CDR) из компартмента и количественного анализа результатов сканирования пептидных идентификаторов из того же компартмента. Для каждого подвергнутого секвенированию пептидного идентификатора идентифицировали соответствующие TCR последовательности. Идентифицируют множество TCR, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении одного или нескольких пептидов пептидной библиотеки, и идентифицируют множество пептидов, которые демонстрируют аффинность связывания в отношении одного или нескольких TCR.

[0235] Сравнивали полученные от субъектов результаты. Идентифицировали пептиды и TCR последовательности, которые связаны с диабетом I типа. Идентифицированные пептиды и TCR последовательности применяются в рамках толерогенной клеточной терапии, например размноженных *ex vivo* олигоклональных Treg-поляризованных Т-клетках, экспрессирующих TCR, являющийся специфичным в отношении аутоиммунных антигенов.

Пример 21: Получение пористого гидрогеля

[0236] В данном примере демонстрируется получение пористых гидрогелей, которые могут применяться в композициях и способах по изобретению. Гидрогельные шарики получали путем смешивания единиц акриламидного мономера и единиц бис-акриламидного поперечного линкера при различных относительных концентрациях наряду со смесью акрированных олигонуклеотидных праймеров, инкапсулированных в каплях с помощью микрожидкостного генератора капель, и инкубирования смеси до завершения поперечного сшивания. В данном примере предварительно подвергнутая поперечному сшиванию водная смесь включала 0,75% бис-акриламида, 3% акриламида, 5 мкМ 5'-акрированного обратного праймера #1, 25 мкМ 3'-кэпированного (фосфорилированного) и 5'-акрированного обратного праймера #2 (Фиг.16), 0,5% персульфата аммония в 10% TEBST (трис-ЭДТА-забуференный физраствор плюс твин-20). Праймеры могут быть сконструированы для включения последовательностей для ферментативного расщепления, например последовательностей, являющихся мишенью рестрикционного фермента, для обеспечения высвобождения части праймера из гидрогеля. Может применяться любой подходящий рестрикционный фермент. В данном примере обратный праймер 1 включал участок расщепления XhoI, а обратный праймер 2 включал участок расщепления FokI. Все реагенты водной смеси соединяли и взбалтывали. В смесь добавляли 1,5% TEMED и 1% 008-FluoroSurfactant, инкапсулированных в каплях, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа и затем трансфицировали в печи при 60°C в течение ночи, таким образом получая гидрогели. Гидрогельные шарики промывали один раз 20% 1Н,1Н,2Н,2Н-перфтор-1-октанолом (PFO), затем промывали три раза TEBST, и затем промывали три раза ТЕ буфером с низким содержанием ЭДТА (1 мМ трис-Cl pH 7,5, 0,1 мМ ЭДТА). Гидрогельные шарики хранили в TEBST при 4°C до использования.

Пример 22: ПЦР полноразмерных антиген-кодирующих матриц на гидрогели (ПЦР

1)

[0237] В данном примере демонстрируется ПЦР полноразмерных антиген-кодирующих матриц на гидрогели. Матрицы линейной ДНК, кодирующей одноцепочечный мультимерный пептид-МНС, подвергали ПЦР-амплификации на гидрогельные шарики в каплях при условиях на основе одиночной матрицы, при которых каждая капля получала не более одной ДНК матрицы. 1,4 мл гидрогельные шарики, полученные в примере 21, смешивали вместе с компонентами ПЦР в 2 мл реакционном объеме следующим образом: 400 мкл реакционного буфера Q5 (New England Biolabs), 40 мкл 10 mM dNTP, 40 мкл 25 мкМ прямого праймера #1, 40 мкл 1 мкМ неакридивированного обратного праймера #1 (Фиг.16), 40 мкл 0,1 пг/мкл матрицы линейной ДНК (или смеси матриц), 8 мкл 20% IGEPAL и 20 мкл Q5 ДНК полимеразы (New England Biolabs). Смесь инкапсулировали в каплях и подвергали 35 циклам ПЦР. После лизиса капель путем добавления равного объема 100% перфтороктанола (PFO) гидрогели промывали 10 объемами ТЕ буфера с низким содержанием ЭДТА пять раз. Аликвоты (10 мкл ЕА) гидрогельных шариков расщепляли рестрикционным ферментом, который обеспечивает расщепления в рамках обратного праймера #1 (в данном примере — XhoI), в течение 1 ч при 37°C и проводили реакцию на 1,2% агарозном геле для количественного анализа выхода и качественного анализа ампликонов на гидрогелях. Как показано на Фиг.17А, полноразмерные антиген-кодирующие матрицы подвергались ПЦР-амплификации на гидрогели.

Пример 23: ПЦР идентификатора (ПЦР 2)

[0238] В данном примере демонстрируется ПЦР амплификация идентификаторов на гидрогелях, полученных в примерах 21 и 22. Могут применяться любые подходящие описанные здесь идентификаторы. В данном примере применяли самоидентификатор, который соответствует всей или части последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид, который он идентифицирует. Промытые гидрогельные шарики после ПЦР 1 расщепляли щелочной фосфатазой креветки (New England Biolabs) для удаления 3' кэпа на обратном праймере #2 и затем дополнительно промывали 4 раз 10 объемами ТЕ буфера с низким содержанием ЭДТА. 300 мкл гидрогельные шарики смешивали вместе с ПЦР компонентами в 400 мкл реакционном объеме следующим образом: 80 мкл реакционного буфера Q5 (New England Biolabs), 8 мкл 10 mM dNTP, 8 мкл 25 мкМ 5'-биотинилированного прямого праймера #2, 1,6 мкл 20% IGEPAL и 4 мкл ДНК полимеразы Q5 (New England Biolabs). Смесь инкапсулировали в каплях и подвергали 20 циклам ПЦР. После лизиса капель путем добавления равного объема 100% PFO гидрогельные шарики

промывали пять раз 10 объемами ТЕ буфера с низким содержанием ЭДТА. Малые аликвоты гидрогельных шариков расщепляли рестрикционным ферментом, который обеспечивает расщепления в рамках обратного праймера #2 (в данном примере — FokI), в течение 1 ч при 37°C и проводили реакцию на 1,2% агарозном геле для количественного анализа выхода и качественного анализа ампликонов идентификатора на гидрогелях. Как показано на **Фиг.17В**, идентификаторы подвергались ПЦР-амплификации на гидрогели ("самоидентифицирующаяся нуклеиновая кислота"). Анализировали три отдельных образца в виде шариков: один с матрицей, соответствующей ЦМВ пептиду, один с ВПЧ пептидом, и один со смесью матриц, кодирующих оба пептида (смесь). Фрагмент самоидентифицирующейся нуклеиновой кислоты, полученный с помощью ПЦР 2, имеет размер ~100 bp.

Пример 24: In vitro транскрипция/трансляция (IVTT) мультимера одноцепочечный пептид-МНС

[0239] В данном примере демонстрируется одноцепочечный пептид-МНС, который может быть *in vitro* транскрибирован и транслирован, например с помощью антиген-кодирующих ДНК матриц на гидрогелях, которые были получены в примерах 21 и 22. 120 мкл гидрогельных шариков совместно инкапсулировали в каплях с 240 мкл IVTT мастер-микса, включая 120 мкл раствора A PURExpress (New England Biolabs), 90 мкл раствора B PURExpress (NEB), 6 мкл RNaseOUT (Invitrogen), 12 мкл каждого из энхансеров #1 и #2 дисульфидных связей (NEB), и 12 мкл протеазы Ulp1 (Invitrogen). Капли инкубировали при 22°C в течение 20 часов без встряхивания. В IVTT реакции добавляли D-биотин до конечной концентрации 500 мкМ перед разбиванием капель путем добавления равного объема 100% PFO. Гидрогелевые шарики промывали пять раз 10 объемами PBS плюс 2% BSA. Аликвоту гидрогелей подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию 1:10 разбавленным меченным Alexa-48 антителом против бета-2-микроглобулина (B2M) (R&D Systems) в PBS плюс 2% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре с последующими пятью 10-кратными промываниями в PBS плюс 2% BSA и сканированию с помощью конфокальной микроскопии (Imagexpress Micro, Molecular Devices, **Фиг.18А**). Окрашивание наблюдали у 21% шариков, что подтверждало основанные на использовании одиночной матрицы условия в рамках ПЦР 1 и успешное получение одноцепочечного пептида-МНС.

Пример 25: Высвобождение меченных идентификатором мультимеров

одноцепочечный пептид-МНС из гидрогелей и анализ

[0240] В данном примере демонстрируется высвобождение подвергнутых фолдингу меченных идентификатором мультимеров одноцепочечный пептид-МНС (sc-pМНС) из гидрогелей. sc-pМНС получали с помощью способов согласно примерам 21, 22, 23 и 24. sc-pМНС мультимеры связывались с гидрогелями с помощью ДНК идентификаторов. sc-pМНС, связанные с гидрогелями с помощью ДНК, могут быть высвобождены из гидрогелей путем расщепления любой подходящей нуклеазой. В данном примере ДНК расщеплялась бензоназой (неспецифической эндонуклеазой) или FokI (рестрикционным ферментом) в буфере Cutsmart (NEB) при инкубировании в течение 20 часов при 22°C. Белок, высвобожденный путем расщепления, тестировали с помощью ELISA для определения выхода и фолдинга. Детектирование осуществляли путем 1:1333 разбавления конъюгированного с HRP антитела против B2M (Biolegend) или конформационно чувствительного антитела против HLA (Santa Cruz) с полученным в НЕК клетках sc-pМНС в качестве стандарта. Анализ ELISA подтверждал высвобождение sc-pМНС мультимера с высоким показателем фолдинга (Фиг.18В). Высвобожденный путем расщепления белок также тестировали с помощью вестерн-блота с электрофорезом на 3-8% трис-ацетатном геле, блоттинга в нитроцеллюлозу, блокирования PBS плюс 3% BSA, и детектирования с помощью 1 мкг/мл первичного антитела крысы против Flag (Biolegend) и 1:1000 конъюгированного с Alexa647 вторичного антитела против IgG крысы (Invitrogen). Медленный переход высвобожденного FokI sc-pМНС мультимера по сравнению с высвобожденным бензоназой sc-pМНС или по сравнению с супернатантом на основе *in vitro* транскрипции/трансляции супернатанта демонстрирует успешное мечение sc-pМНС идентификатором нуклеиновых кислот (Фиг.18С).

Пример 26: Функциональный анализ одноцепочечного мультимерного пептида-МНС, полученного в гидрогелях/каплях

[0241] В данном примере демонстрируется sc-pМНС, полученный с помощью способов по изобретению, являющийся специфично связанным с родственными Т-клетками. Было подтверждено, что sc-pМНС, высвобожденные из гидрогелей, как описано в примере 25, специфично связываются с родственными специфичными в отношении пептидов Т-клетками на основе проточной цитометрии и инкапсулирования в одиночных клетках/секвенирования.

[0242] Для проведения проточной цитометрии 10^5 полученных от доноров Т-клеток, которые были размножены ВПЧ пептидом или ЦМВ пептидом, окрашивали sc-pМНС

мультимерами, полученными из кодирующей ЦМВ пептид матрицы в общем растворе или в каплях, как описано выше. Также для окрашивания применяли контрольные белки, соответствующие мультимерному ЦМВ или ВПЧ рМНС, полученному в НЕК клетках. Все рМНС разбавляли в PBS плюс 10% FBS и применяли APC антитело против Flag (Biolegend) в качестве вторичного антитела. Как показано на **Фиг.19**, ЦМВ sc-рМНС мультимеры, полученные в гидрогелях/каплях, демонстрировали аналогичное окрашивание размноженных ЦМВ Т-клеток, что и полученные в общем объеме или из НЕК клеток. Несмотря на тот факт, что размноженные ВПЧ Т-клетки были почти 100% положительными в плане окрашивания полученными в НЕК клетках ВПЧ рМНС мультимерами, заметное окрашивание полученных в каплях ЦМВ рМНС мультимеров на данных клетках отсутствовало, что подтверждало специфичность.

[0243] Для секвенирования отдельных клеток полученные в каплях ЦМВ sc-рМНС мультимеры с меткой в виде идентификатора на основе нуклеиновой кислоты, как описано в примерах 21-25, обрабатывали экзонуклеазой T7 (NEB). Затем ЦМВ sc-рМНС мультимеры смешивали с полученными в НЕК клетках ВПЧ рМНС мультимерами, которые метили отличительным идентификатором. Данную смесь антигенов применяли для окрашивания смеси размноженных ВПЧ и ЦМВ Т-клеток, которые далее подвергали секвенированию с использованием отдельных клеток. Секвенирование с использованием отдельных клеток демонстрировало отличную специфичность полученных в гидрогеле/каплях ЦМВ sc-рМНС мультимеров. Как показано на **Фиг.20**, UMI (уникальные клеточные идентификаторы), соответствующие полученным в каплях ЦМВ рМНС, связаны с Т-клетками, которые были размножены с помощью ЦМВ пептида, но не теми, которые были размножены с помощью ВПЧ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидная библиотека, включающая совокупность пептидов, при этом совокупность пептидов включает более 1000, более 2000, более 5000, более 10000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов.
2. Пептидная библиотека по п.1, отличающаяся тем, что совокупность пептидов включает совокупность антигенов.
3. Пептидная библиотека по любому из п.п.1-2, отличающаяся тем, что совокупность пептидов включает совокупность рМНС мультимеров.
4. Пептидная библиотека по любому из п.п.1-3, отличающаяся тем, что совокупность пептидов включает совокупность sc-рМНС.
5. Пептидная библиотека по любому из п.п.1-4, отличающаяся тем, что пептид совокупности присоединен к нуклеотидной последовательности.
6. Пептидная библиотека по п.5, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой идентификатор.
7. Пептидная библиотека по любому из п.п.5-6, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность кодирует нуклеотидную последовательность пептида.
8. Пептидная библиотека по любому из п.п.5-7, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность имеет длину от 25 нуклеотидов до 500 нуклеотидов.
9. Пептидная библиотека по любому из п.п.5-8, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность имеет длину от 80 нуклеотидов до 120 нуклеотидов.
10. Пептидная библиотека по любому из п.п.3-9, отличающаяся тем, что МНС рМНС представляет собой МНС-I.

11. Пептидная библиотека по любому из п.п.3-10, отличающаяся тем, что МНС рМНС представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.
12. Пептидная библиотека по любому из п.п.3-11, отличающаяся тем, что МНС рМНС представляет собой HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA или HLA-DRB1.
13. Библиотека подмножества пептидов, включающая совокупность пептидов по любому из п.п.1-12, отличающаяся тем, что пролиферация Т-клетки индуцируется при связывании пептида совокупности пептидов по любому из п.п.1-12 с TCR Т-клетки.
14. Библиотека подмножества пептидов, включающая совокупность пептидов по любому из п.п.1-12, отличающаяся тем, что цитотоксичность Т-клетки индуцируется при связывании пептида совокупности пептидов по любому из п.п.1-12 с TCR Т-клетки.
15. Библиотека подмножества пептидов, включающая совокупность пептидов по любому из п.п.1-12, отличающаяся тем, что супрессия Т-клетки индуцируется при связывании пептида совокупности пептидов по любому из п.п.1-12 с TCR Т-клетки.
16. Библиотека подмножества пептидов, включающая совокупность пептидов по любому из п.п.1-12, отличающаяся тем, что опосредованная Т-клеткой супрессия индуцируется при связывании пептида совокупности пептидов по любому из п.п.1-12 с TCR Т-клетки.
17. Библиотека подмножества пептидов, включающая совокупность пептидов по любому из п.п.1-12, отличающаяся тем, что продуцирование цитокинов Т-клетки индуцируется при связывании пептида совокупности пептидов по любому из п.п.1-12 с TCR Т-клетки.
18. Способ выделения пар лимфоцит-пептид, включающий:
 - (а) контактирование совокупности лимфоцитов с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 1000 пептидов; и

(b) получение совокупности компартментов, при этом компартмент совокупности включает (i) лимфоцит из совокупности лимфоцитов, связанный с пептидом из пептидной библиотеки, и (ii) носитель для захвата.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что лимфоцит представляет собой Т-клетку, В-клетку, или NK-клетку.

20. Способ по любому из п.п.18-19, отличающийся тем, что пептидная библиотека включает более 2000, более 5000, более 10000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов.

21. Способ по любому из п.п.18-20, отличающийся тем, что совокупность пептидов включает совокупность антигенов.

22. Способ по любому из п.п.18-21, отличающийся тем, что совокупность пептидов включает совокупность рМНС мультимеров.

23. Способ по любому из п.п.18-22, отличающийся тем, что совокупность пептидов включает совокупность sc-рМНС.

24. Способ по любому из п.п.18-23, отличающийся тем, что пептид совокупности присоединен к нуклеотидной последовательности.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой идентификатор.

26. Способ по любому из п.п.24-25, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность кодирует нуклеотидную последовательность пептида.

27. Способ по любому из п.п.24-26, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность имеет длину от 25 нуклеотидов до 500 нуклеотидов.

28. Способ по любому из п.п.24-27, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность имеет длину от 80 нуклеотидов до 120 нуклеотидов.

29. Способ по любому из п.п.22-28, отличающийся тем, что МНС рМНС представляет собой МНС-I.
30. Способ по любому из п.п.22-29, отличающийся тем, что МНС рМНС представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.
31. Способ по любому из п.п.22-30, отличающийся тем, что МНС рМНС представляет собой HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA или HLA-DRB1.
32. Способ идентификации пары лимфоцит-пептид, включающий:
- (а) контактирование совокупности лимфоцитов с пептидной библиотекой, при этом пептидная библиотека включает более 1000 пептидов;
 - (б) компартиментализацию лимфоцита из совокупности лимфоцитов, связанного с пептидом из пептидной библиотеки, в отдельном компартменте, при этом пептид включает уникальный пептидный идентификатор; и
 - (с) определение уникального пептидного идентификатора для каждого пептида, связанного с компартиментализированным лимфоцитом.
33. Способ по п.32, отличающийся тем, что лимфоцит представляет собой Т-клетку, В-клетку, или NK-клетку.
34. Способ по любому из п.п.32-33, отличающийся тем, что пептидная библиотека включает более 2000, более 5000, более 10000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов.
35. Способ по любому из п.п.32-34, отличающийся тем, что совокупность пептидов включает совокупность антигенов.
36. Способ по любому из п.п.32-35, отличающийся тем, что совокупность пептидов включает совокупность рМНС мультимеров.
37. Способ по любому из п.п.32-36, отличающийся тем, что совокупность пептидов включает совокупность sc-рМНС.

38. Способ по любому из п.п.36-37, отличающийся тем, что МНС рМНС представляет собой МНС-I.
39. Способ по любому из п.п.36-38, отличающийся тем, что МНС рМНС представляет собой HLA-A, HLA-B или HLA-C.
40. Способ по любому из п.п.36-39, отличающийся тем, что МНС рМНС представляет собой HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA или HLA-DRB1.
41. Способ по любому из п.п.32-40, отличающийся тем, что пара лимфоцит-пептид представляет собой пару TCR-антиген.
42. Способ по любому из п.п.32-41, дополнительно включающий определение идентичности рецептора на компартментализированном лимфоците.
43. Способ по п.42, отличающийся тем, что определение идентичности включает секвенирование варибельного участка, гиперварибельного участка или определяющего комплементарность участка (CDR) TCR, BCR или антитела.
44. Способ по п.43, отличающийся тем, что CDR представляет собой CDR1, CDR2 или CDR3 альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, тяжелой цепи антитела или легкой цепи антитела.
45. Способ применения объективной пептидной библиотеки, при этом способ включает контактирование образца с объективной пептидной библиотекой, включающей совокупность пептидов, при этом совокупность пептидов включает более 100, более 1000, более 2000, более 5000, более 10000, более 10^6 , более 10^7 , более 10^8 , более 10^9 или более 10^{10} уникальных пептидов.
46. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из генома организма.

47. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из транскриптома организма.
48. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из протеома организма.
49. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из пептида или белка организма.
50. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из эпитопа организма.
51. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из последовательностей, различающихся между геномами.
52. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из последовательностей, различающихся между транскриптомами.
53. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из последовательностей, различающихся между протеомами.
54. Способ по любому из п.п.51-53, отличающийся тем, что различающиеся последовательности включают последовательности из подверженной заболеванию клетки и здоровой клетки.
55. Способ по любому из п.п.51-54, отличающийся тем, что различающиеся последовательности включают последовательности из раковой клетки и здоровой клетки.
56. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из последовательностей, являющихся гомологичными между геномами.
57. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из последовательностей, являющихся гомологичными между транскриптомами.

58. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека получена из последовательностей, являющихся гомологичными между протеомами.
59. Способ по любому из п.п.56-58, отличающийся тем, что гомологичные последовательности включают последовательности из подверженной заболеванию клетки и здоровой клетки.
60. Способ по любому из п.п.56-59, отличающийся тем, что гомологичные последовательности включают последовательности из связанной с аутоиммунитетом клетки и здоровой клетки.
61. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека включает объективную библиотеку рМНС мультимеров.
62. Способ по п.45, отличающийся тем, что объективная пептидная библиотека включает объективную библиотеку sc-рМНС.
63. Способ по п.61, отличающийся тем, что антигены рМНС мультимеров объективной библиотеки рМНС мультимеров являются объективными.
64. Способ по п.62, отличающийся тем, что антигены sc-рМНС объективной библиотеки sc-рМНС являются объективными.
65. Композиция, включающая рМНС мультимер, присоединенный к уникальному идентификатору.
66. Композиция по п.65, отличающаяся тем, что рМНС мультимер представляет собой sc-рМНС.
67. Композиция по п.65 или п.66, отличающаяся тем, что уникальный идентификатор представляет собой нуклеиновую кислоту.
68. Композиция по любому из п.п.65-67, отличающаяся тем, что уникальный идентификатор представляет собой самоидентификатор.

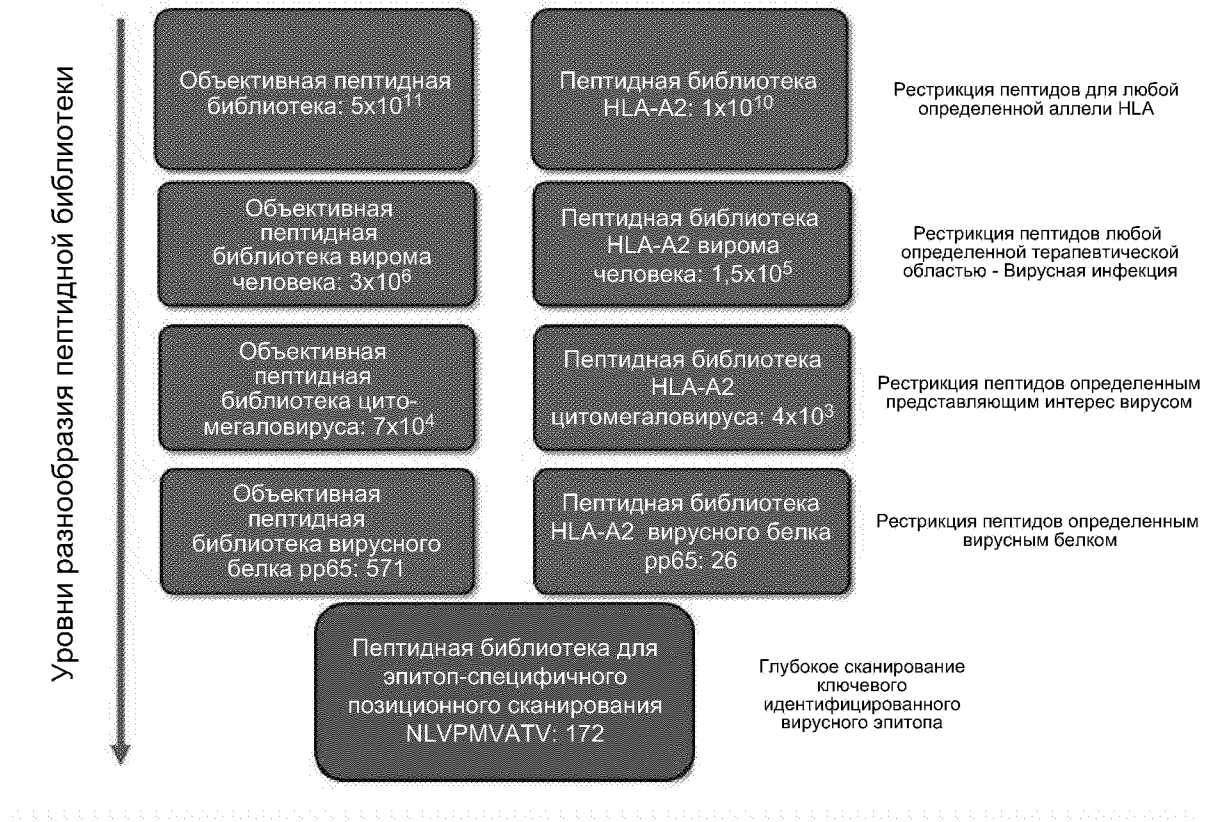
69. Композиция по любому из п.п.65-67, отличающаяся тем, что уникальный идентификатор не является самоидентификатором.
70. Композиция по любому из п.п.65-69, отличающаяся тем, что уникальный идентификатор имеет длину от 25 нуклеотидов до 120 нуклеотидов.
71. Компаратмент, включающий:
(a) последовательность, кодирующую sc-pMHC; и
(b) Т-клетку.
72. Композиция, включающая:
(a) гидрогелевый шарик; и
(b) нуклеиновую кислоту, присоединенную к гидрогелевому шарiku, при этом нуклеиновая кислота кодирует пептид.
73. Композиция по п.72, дополнительно включающая вторую нуклеиновую кислоту, присоединенную к гидрогелевому шарiku, при этом вторая нуклеиновая кислота включает идентификатор.
74. Композиция по п.73, отличающаяся тем, что идентификатор представляет собой самоидентификатор.
75. Композиция по п.73, отличающаяся тем, что идентификатор не является самоидентификатором.
76. Композиция по любому из п.п.72-75, дополнительно включающая пептид, при этом пептид присоединен к гидрогелевому шарiku.
77. Композиция по любому из п.п.73-75, дополнительно включающая пептид, при этом пептид присоединен к третьей нуклеиновой кислоте, а третья нуклеиновая кислота присоединена к гидрогелевому шарiku.

78. Композиция по п.77, отличающаяся тем, что третья нуклеиновая кислота включает идентификатор.
79. Композиция по любому из п.п.72-78, отличающаяся тем, что гидрогелевый шарик инкапсулирован в капле.
80. Композиция по любому из п.п.72-79, отличающаяся тем, что пептид включает sc-pMHC.
81. Композиция по п.80, отличающаяся тем, что MHC sc-pMHC представляет собой MHC-I.
82. Композиция по п.80, отличающаяся тем, что MHC sc-pMHC представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.
83. Способ по п.80, отличающийся тем, что MHC sc-pMHC представляет собой HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA или HLA-DRB1.
84. Способ получения меченного идентификатором пептида, включающий:
- (а) предоставление носителя для захвата, при этом носитель для захвата включает присоединенную нуклеиновую кислоту, которая включает идентификатор;
 - (б) присоединение пептида к нуклеиновой кислоте;
 - (с) отделение нуклеиновой кислоты или ее части от носителя для захвата, что обеспечивает высвобождение меченного идентификатором пептида.
85. Способ по п.84, отличающийся тем, что идентификатор представляет собой самоидентификатор.
86. Способ по п.84, отличающийся тем, что идентификатор не является самоидентификатором.
87. Способ по любому из п.п.84-86, отличающийся тем, что пептид включает антиген.
88. Способ по любому из п.п.84-87, отличающийся тем, что пептид включает sc-pMHC.

89. Способ по п.88, отличающийся тем, что МНС sc-pMHC представляет собой МНС-I.
90. Способ по п.88, отличающийся тем, что МНС sc-pMHC представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.
91. Способ по п.88, отличающийся тем, что МНС sc-pMHC представляет собой HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA или HLA-DRB1.
92. Способ по любому из п.п.84-91, отличающийся тем, что отделение включает ферментативное расщепление.
93. Способ по любому из п.п.84-92, отличающийся тем, что носитель для захвата инкапсулирован в капле.
94. Способ по любому из п.п.84-93, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота имеет длину от 25 нуклеотидов до 500 нуклеотидов.
95. Способ по любому из п.п.84-93, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота имеет длину от 80 нуклеотидов до 120 нуклеотидов.
96. Способ получения пептидной библиотеки, включающий получение совокупности меченных идентификатором пептидов с помощью способа по любому из п.п.84-95.
97. Способ получения меченного идентификатором пептида, включающий:
- (a) предоставление носителя для захвата, при этом носитель для захвата имеет первую присоединенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует пептид, и вторую присоединенную нуклеиновую кислоту, которая включает идентификатор;
 - (b) получение пептида;
 - (c) присоединение пептида к второй нуклеиновой кислоте, что обеспечивает получение меченного идентификатором пептида; и
 - (d) отделение второй нуклеиновой кислоты или ее части от носителя для захвата, что обеспечивает высвобождение меченного идентификатором пептида.

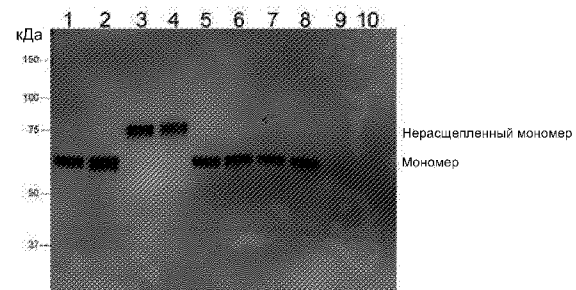
98. Способ по п.97, отличающийся тем, что идентификатор представляет собой самоидентификатор.
99. Способ по п.97, отличающийся тем, что идентификатор не является самоидентификатором.
100. Способ по любому из п.п.97-99, отличающийся тем, что получение включает *in vitro* транскрипцию и трансляцию.
101. Способ по любому из п.п.97-100, отличающийся тем, что пептид включает антиген.
102. Способ по любому из п.п.97-101, отличающийся тем, что пептид включает sc-pMHC.
103. Способ по п.102, отличающийся тем, что MHC sc-pMHC представляет собой MHC-I.
104. Способ по п.102, отличающийся тем, что MHC sc-pMHC представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.
105. Способ по п.102, отличающийся тем, что MHC sc-pMHC представляет собой HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA или HLA-DRB1.
106. Способ по любому из п.п.97-105, отличающийся тем, что отделение включает ферментативное расщепление.
107. Способ по любому из п.п.97-106, отличающийся тем, что носитель для захвата инкапсулирован в капле.
108. Способ по любому из п.п.97-107, отличающийся тем, что вторая нуклеиновая кислота имеет длину от 25 нуклеотидов до 500 нуклеотидов.
109. Способ по любому из п.п.97-107, отличающийся тем, что вторая нуклеиновая кислота имеет длину от 80 нуклеотидов до 120 нуклеотидов.

110. Способ получения пептидной библиотеки, включающий получение совокупности меченных идентификатором пептидов с помощью способа по любому из п.п.97-109.

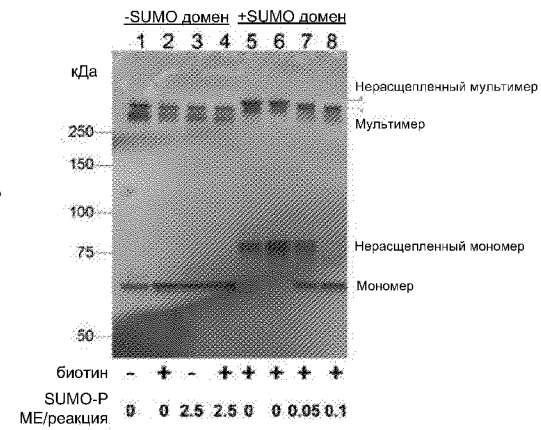


Фиг.1

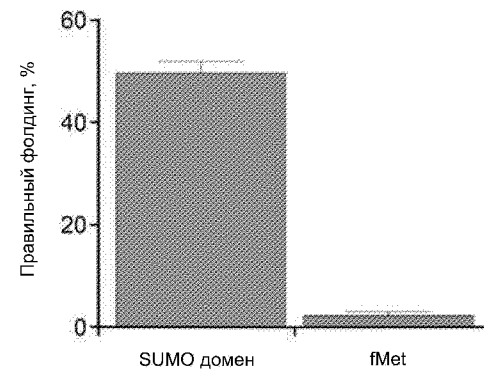
Фиг.2А



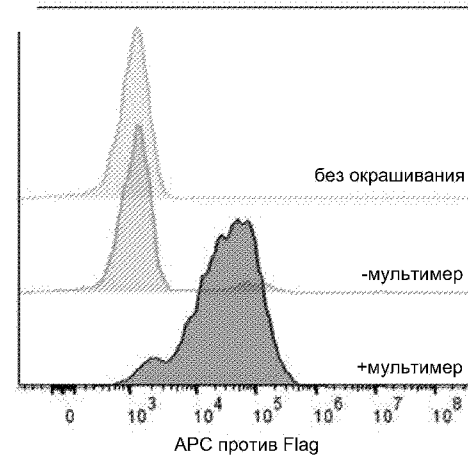
Фиг.2В

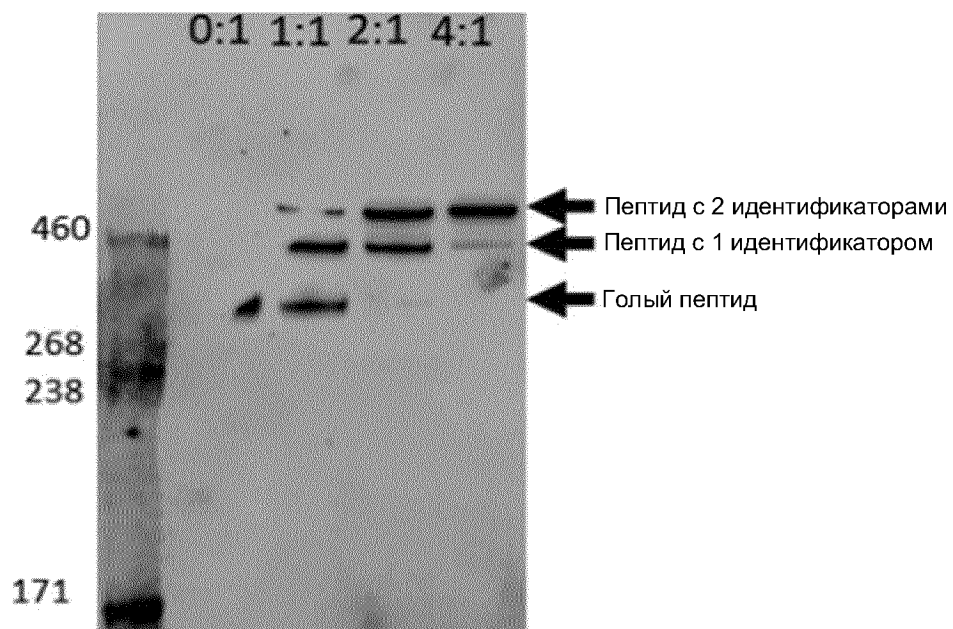


Фиг.2С

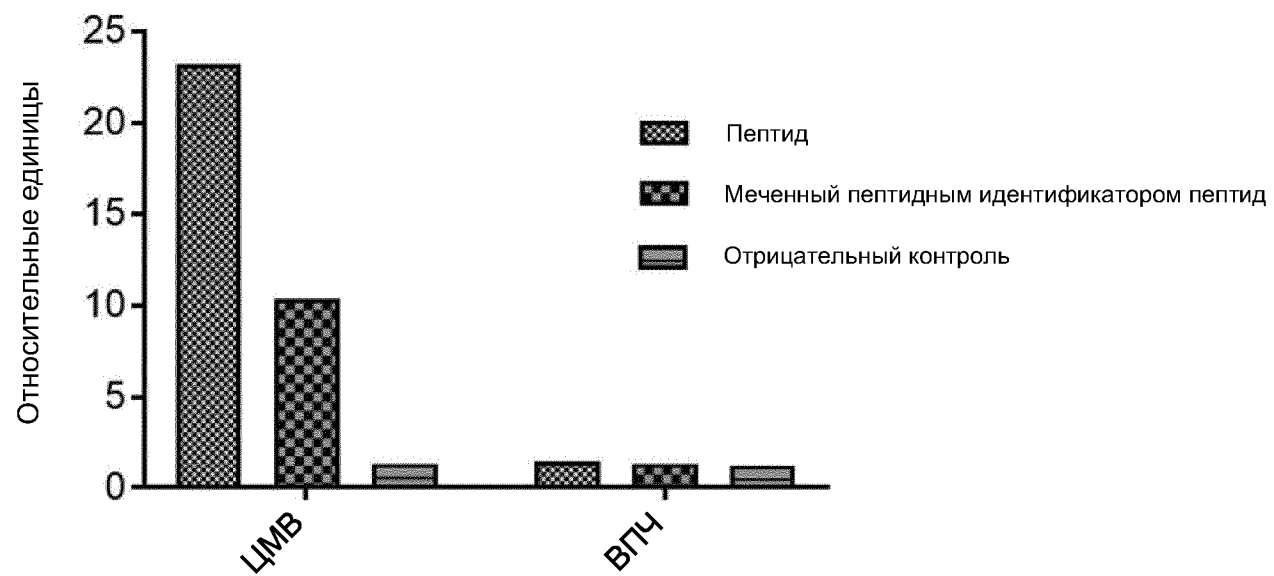


Фиг.2D

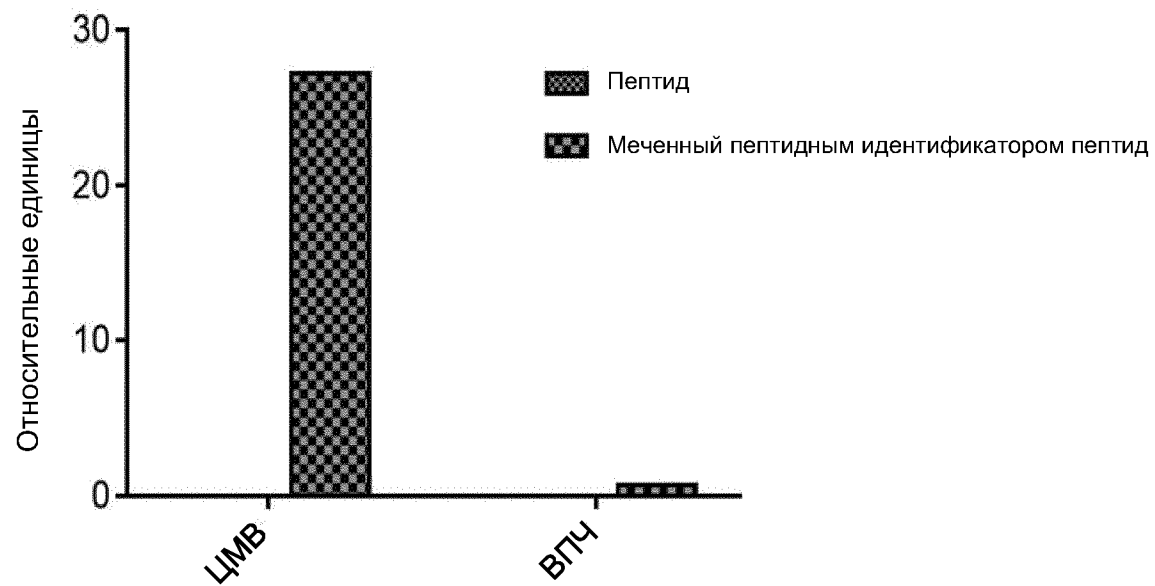




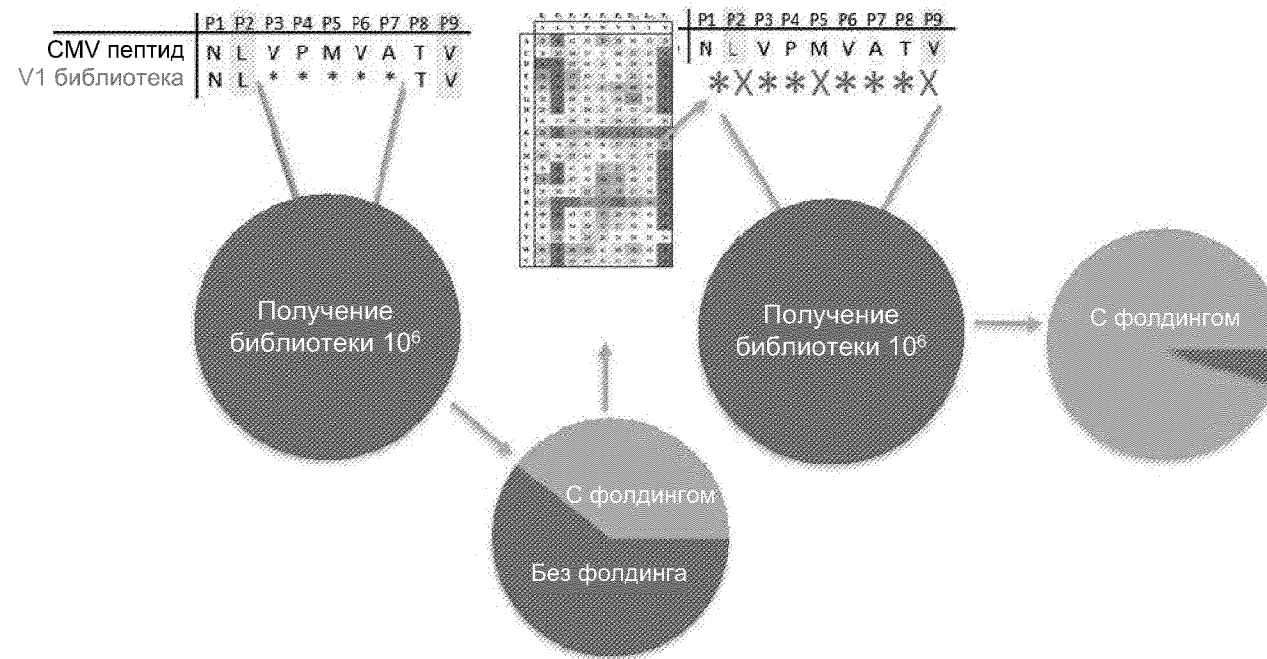
Фиг.3



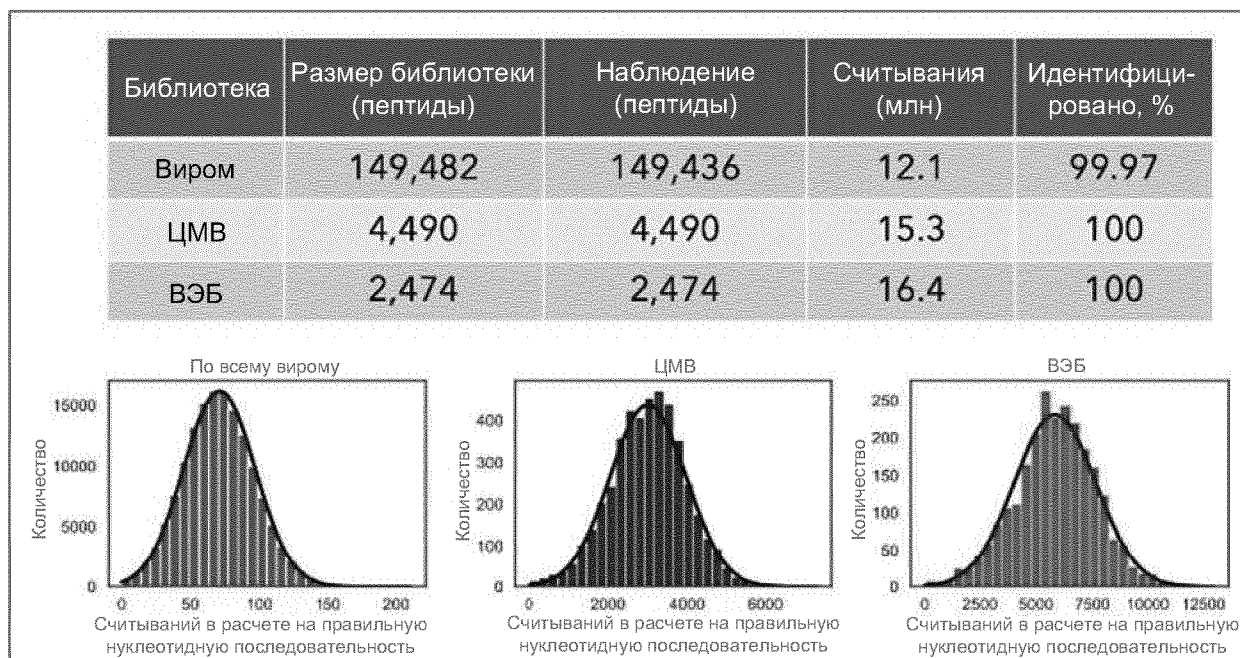
Фиг.4



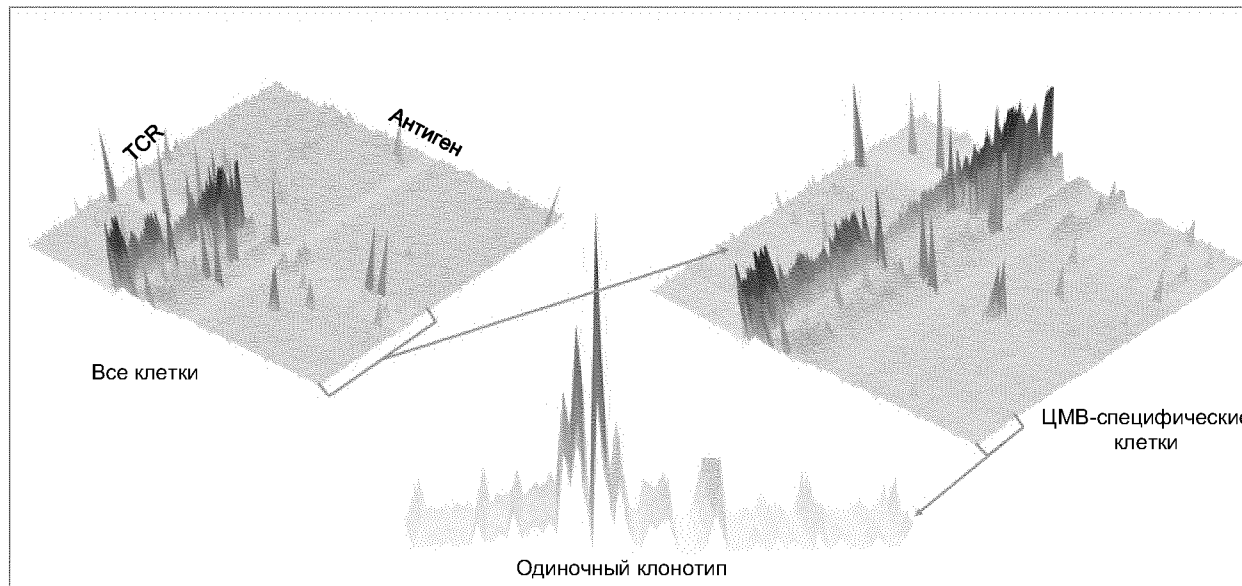
Фиг.5



Фиг.6

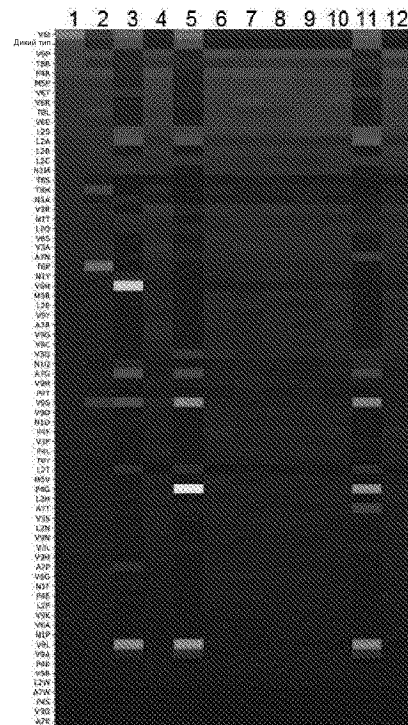


Фиг.7

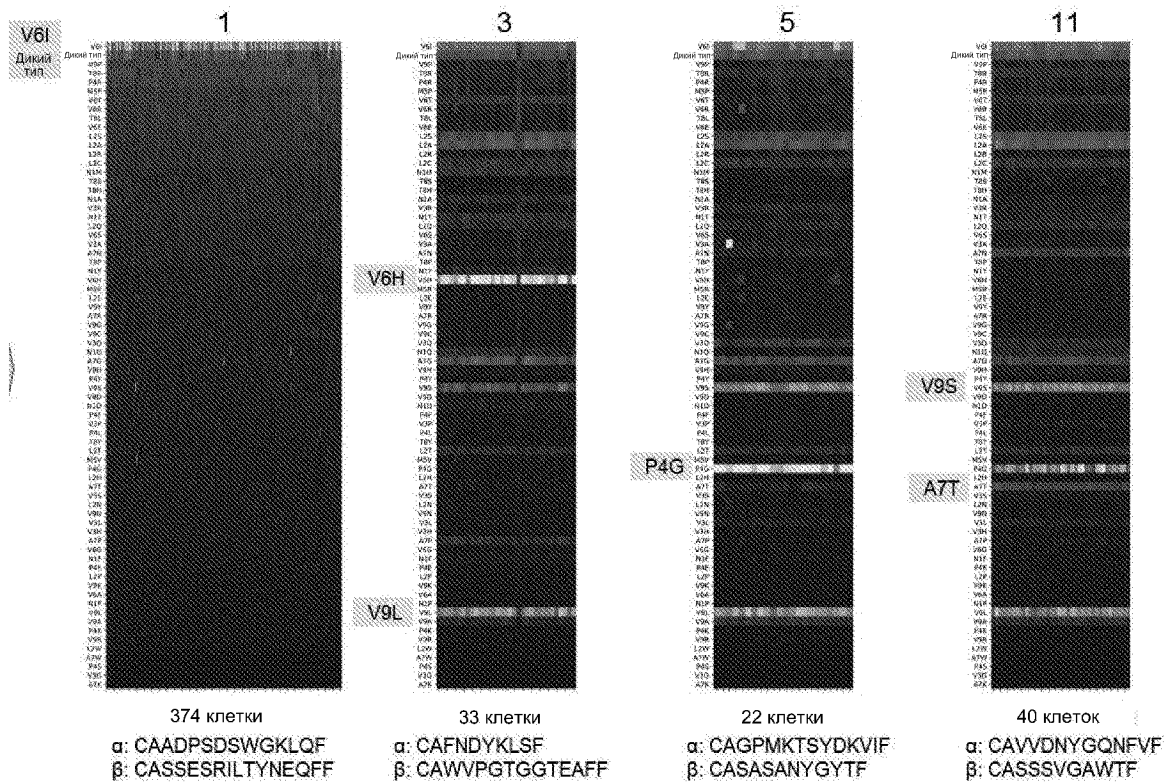


Фиг.8

Пациент 46: Основные 12 клонотипов

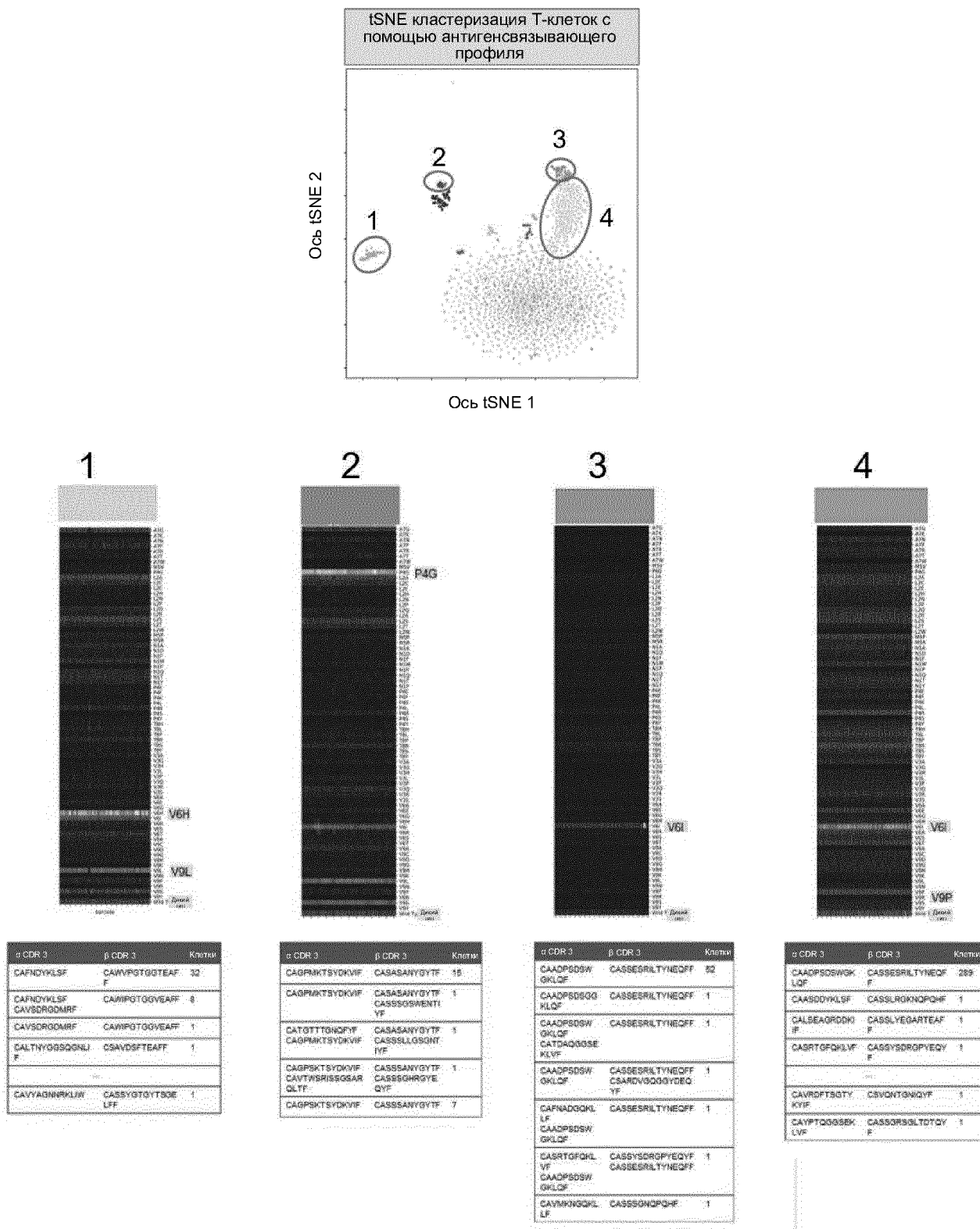


Основные клонотипы Т-клеток



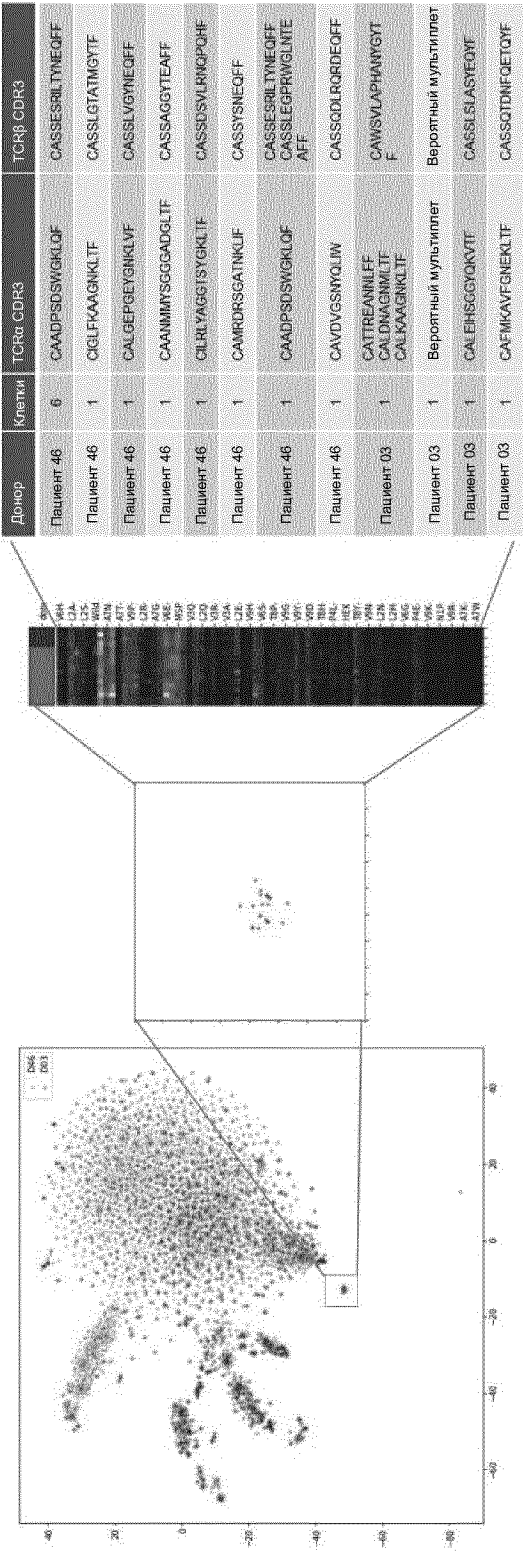
Фиг.9А

Фиг.9



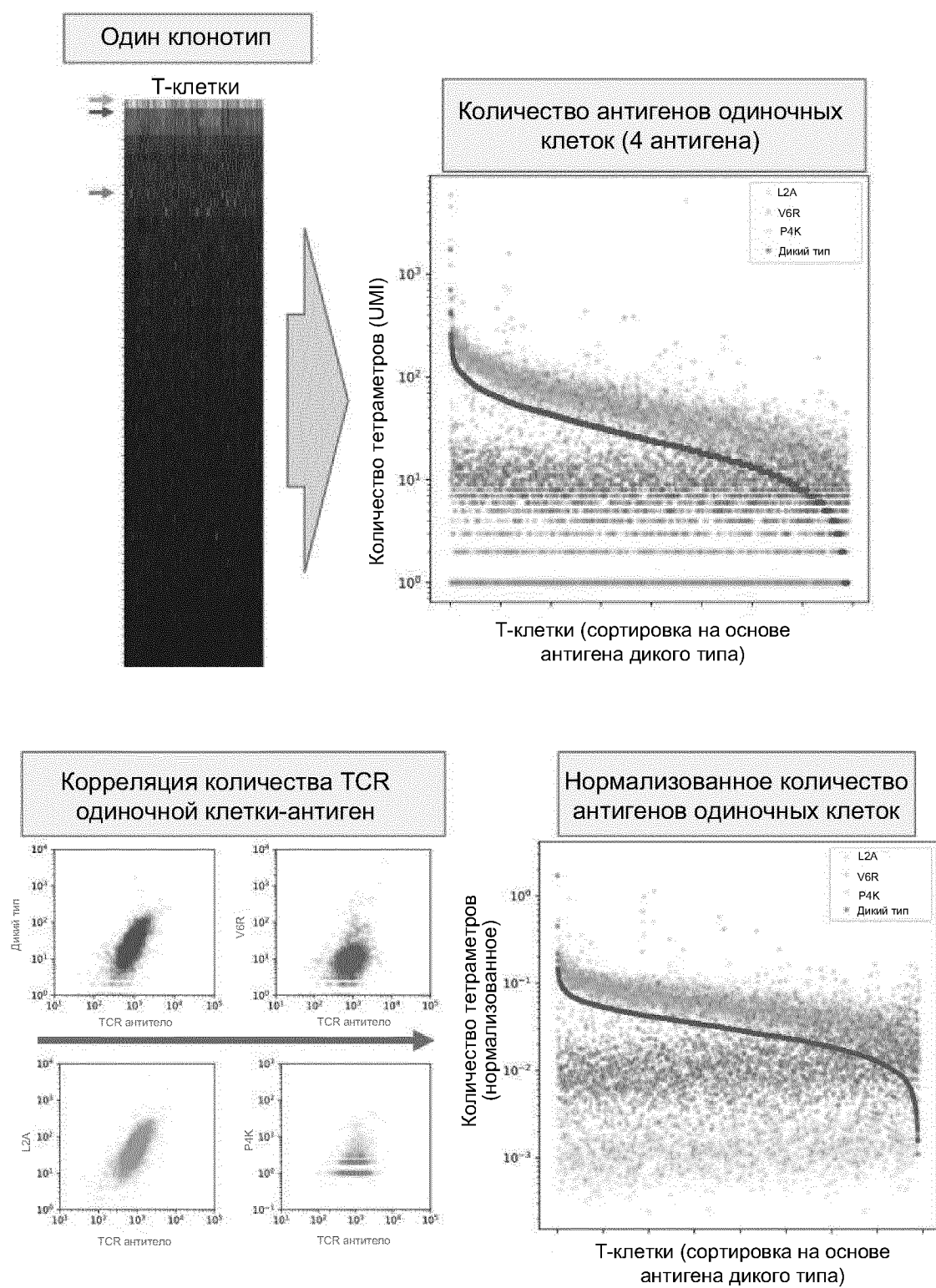
Фиг.9В

Фиг.9

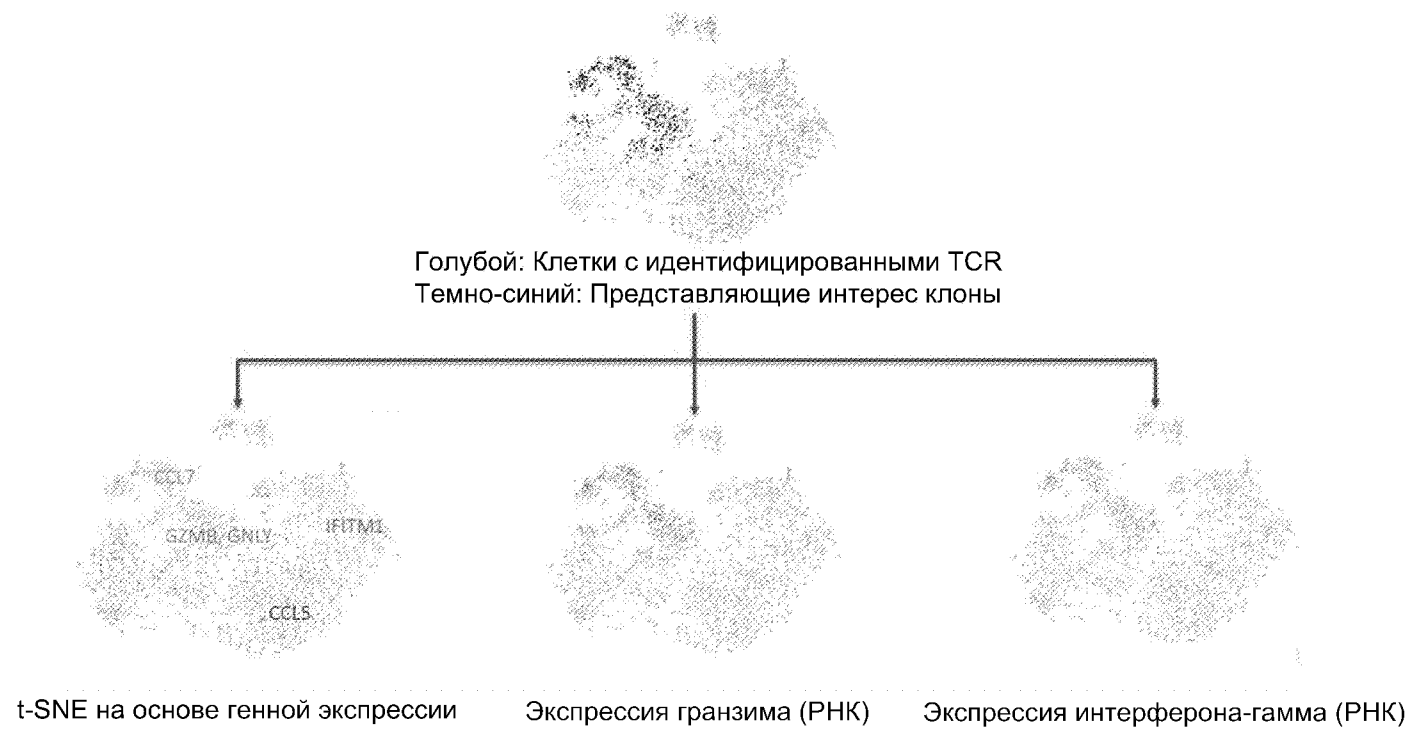


Фиг.9С

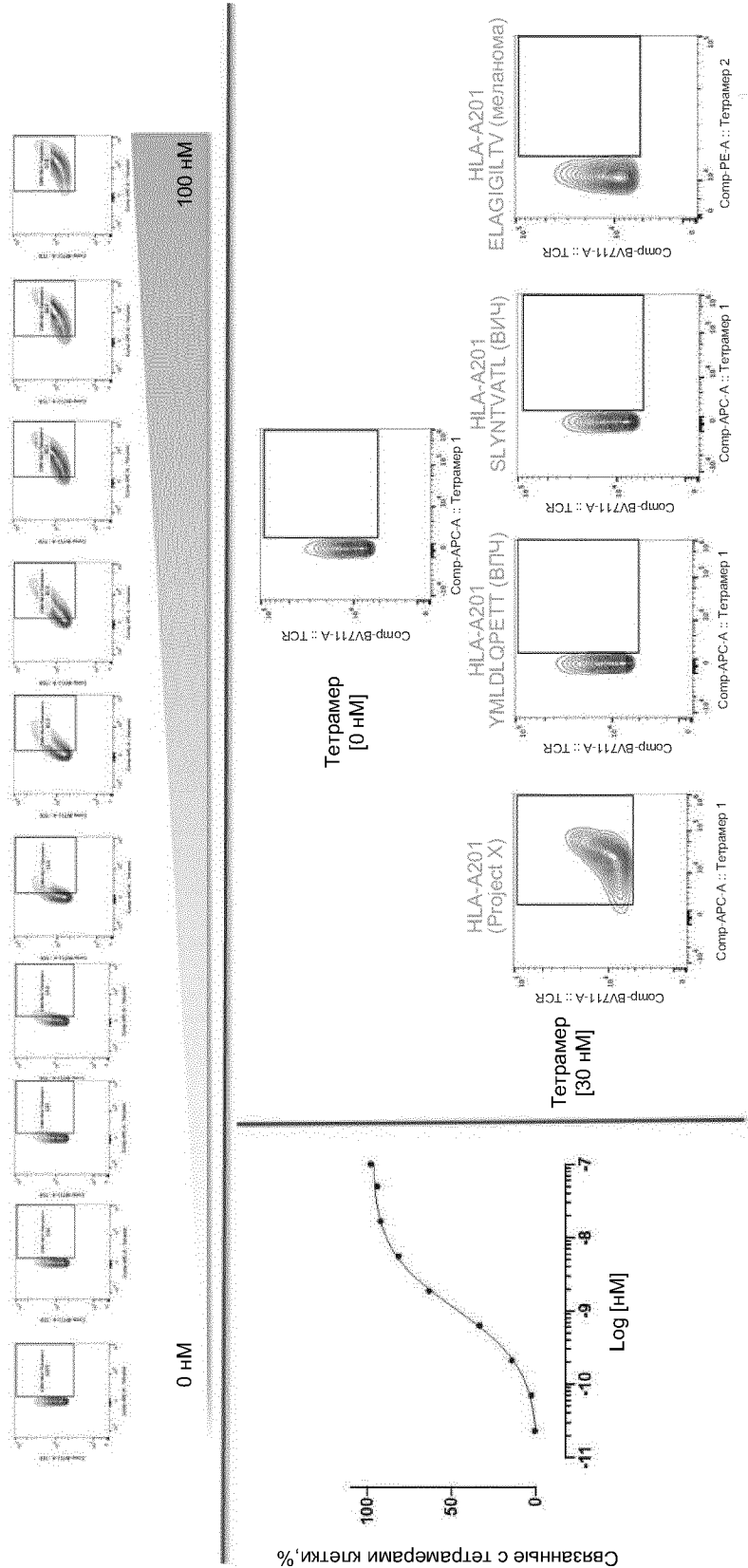
Фиг.9



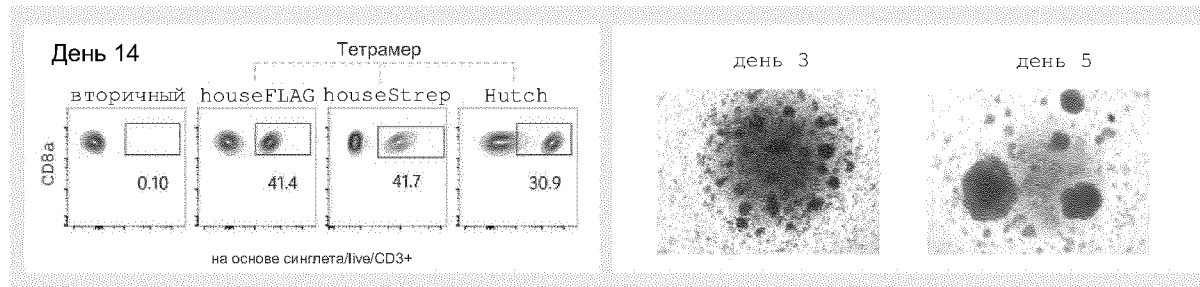
Фиг.10



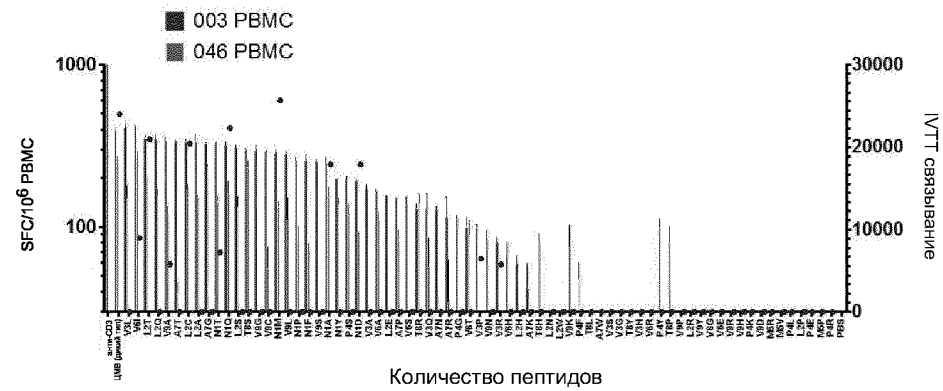
Фиг.11



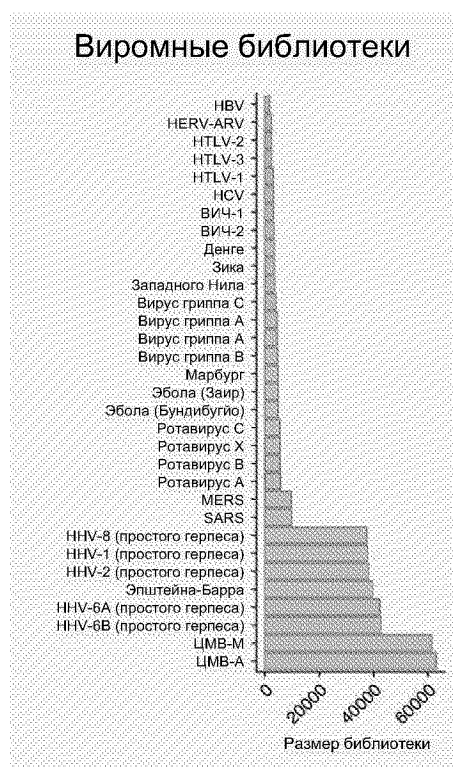
Фиг.12



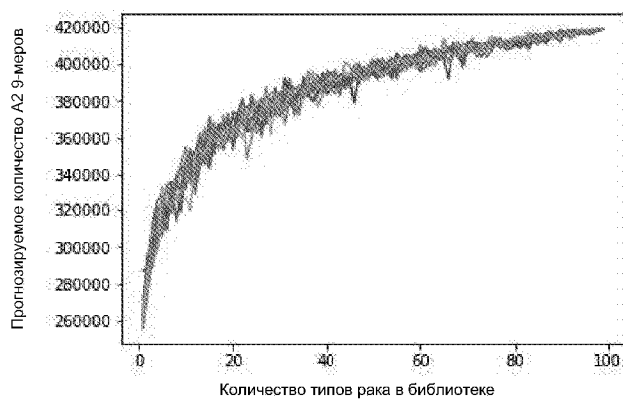
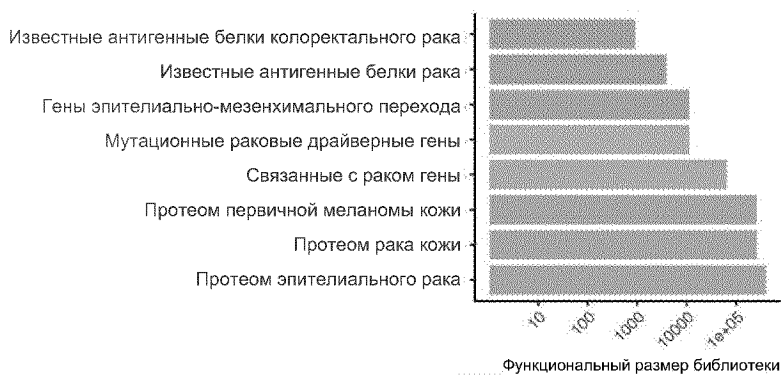
PBMC: ELISpot IFN- γ



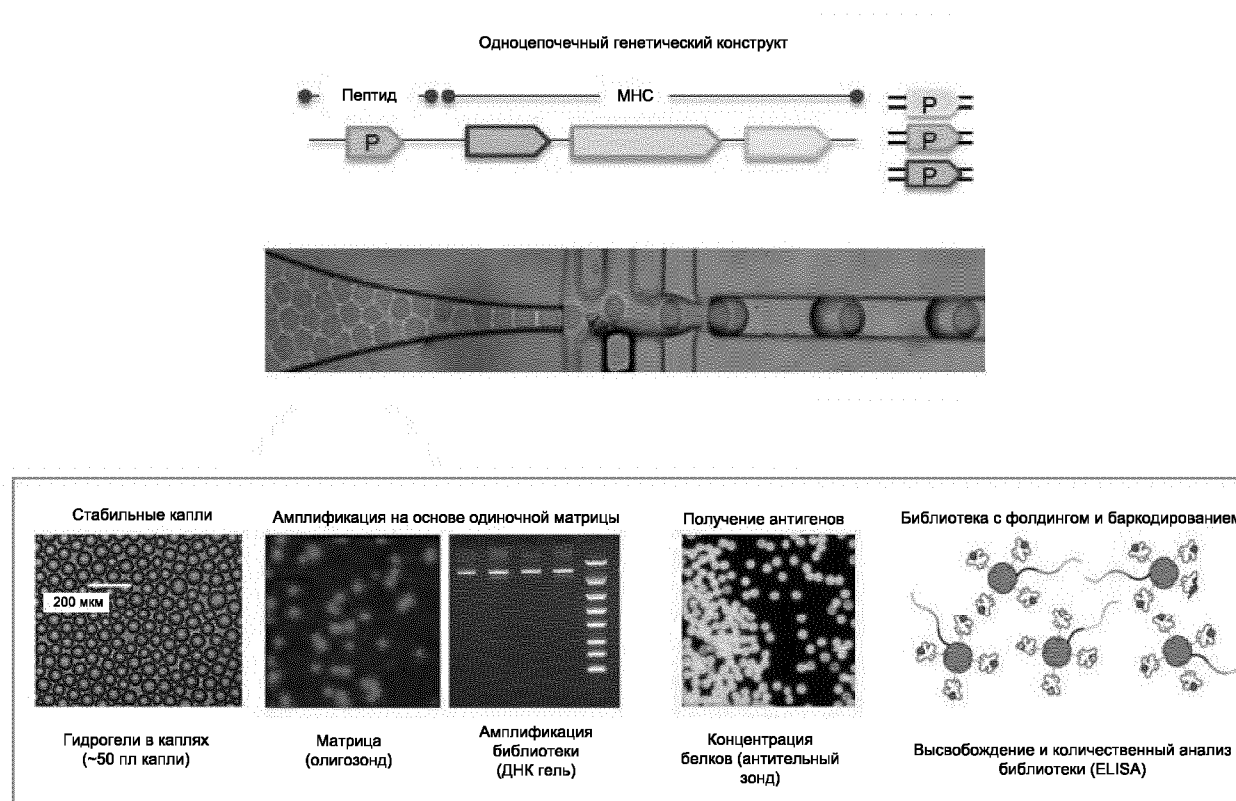
Фиг.13



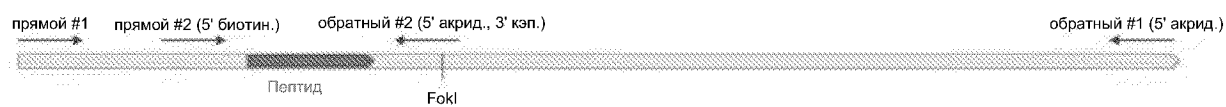
Фиг.14А



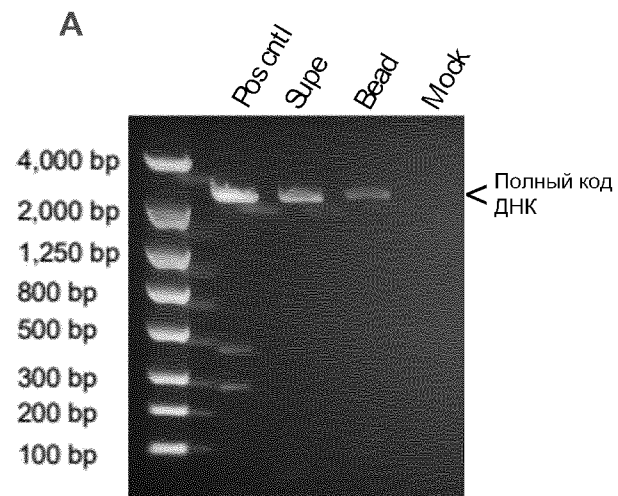
Фиг.14В



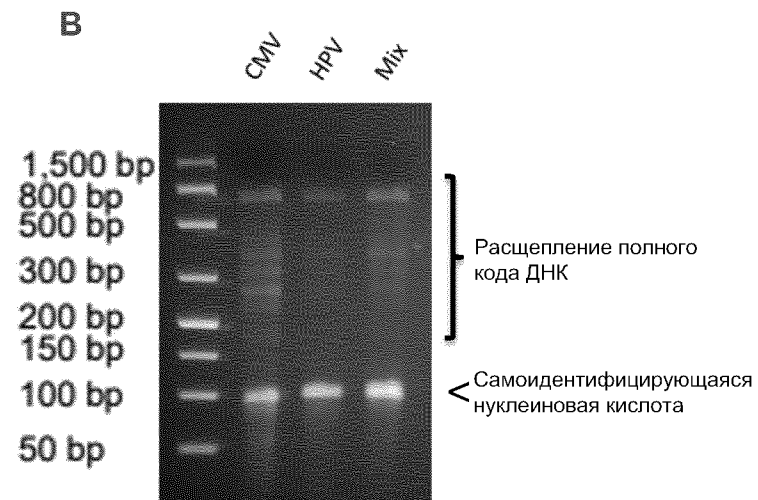
Фиг.15



Фиг.16

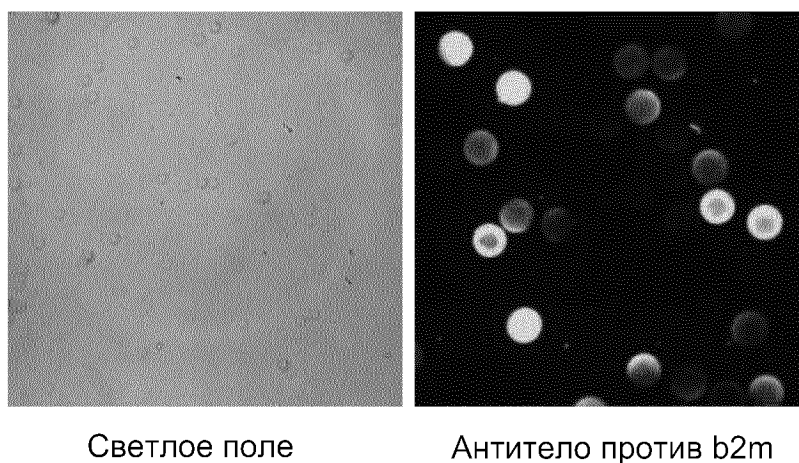


Фиг.17А

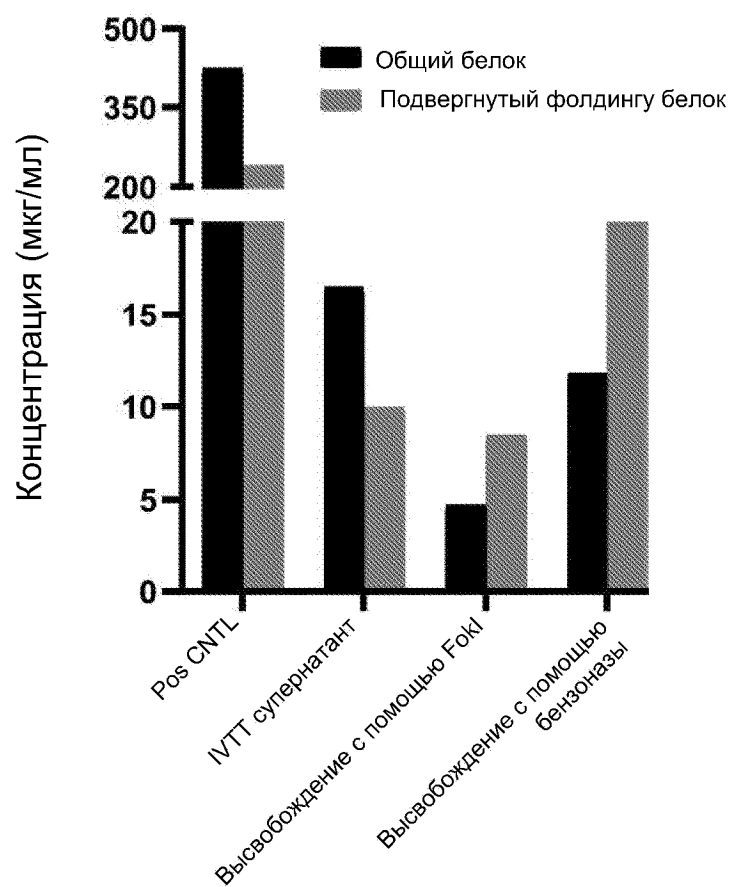


Фиг.17В

Фиг.17

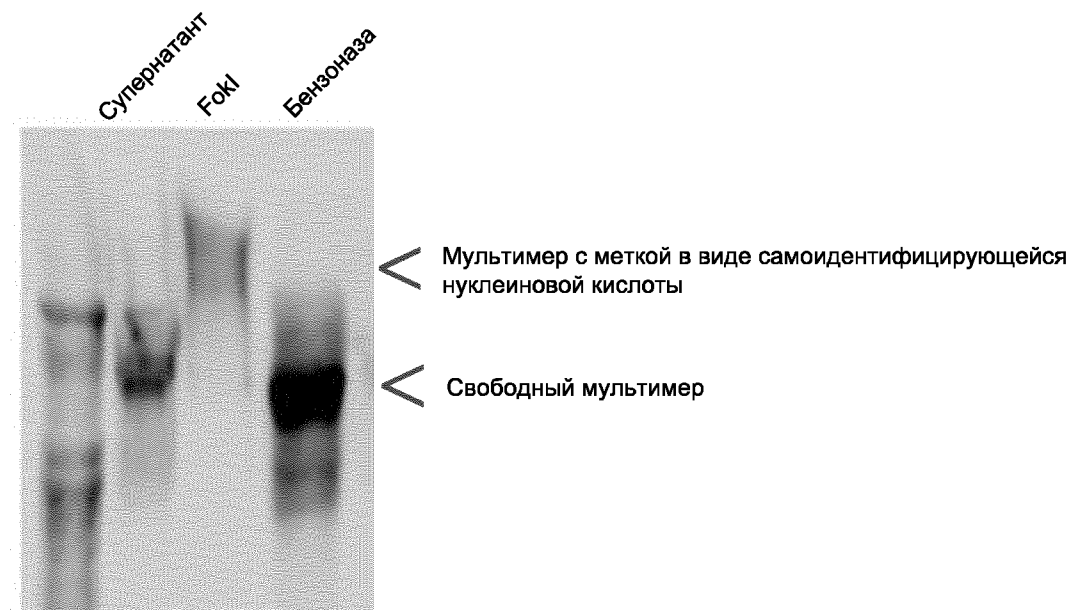


Фиг.18А



Фиг.18В

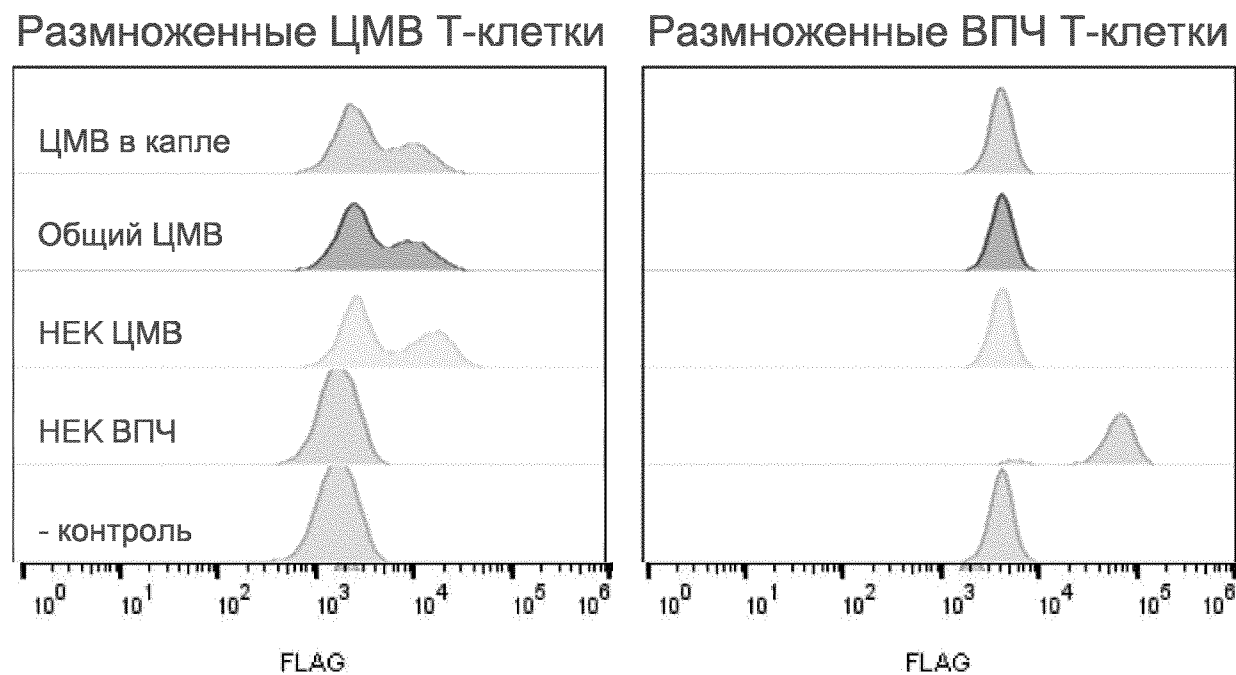
Фиг.18



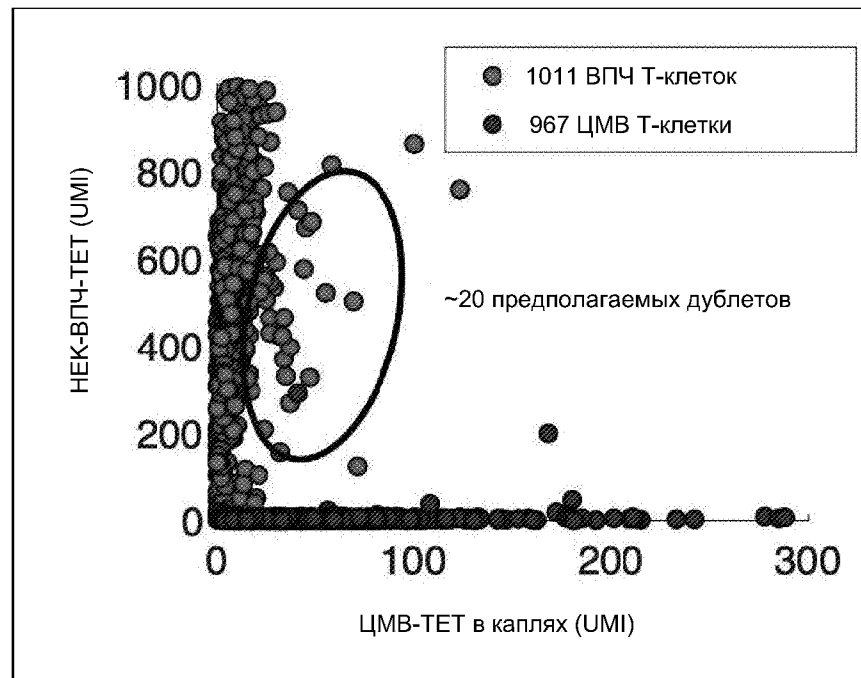
Вестерн-блот на основе антитела против Flag

Фиг.18С

Фиг.18



Фиг.19



Фиг.20