

# ВЫЯВЛЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ МУТАНТНЫХ НЕОАНТИГЕНОВ В ГЕНОМЕ МЕЛАНОМЫ МЫШЕЙ

В.С. Косоруков<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>1</sup>, Е.Н. Кособокова<sup>1</sup>, Д.Ю. Яковичина<sup>2</sup>, А.С. Ершова<sup>2</sup>, Ю.А. Пеков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ООО «Ксивелью»; Россия, 119049 Москва, Ленинский проспект, 30А

**Контакты:** Мария Анатольевна Барышникова [ma\\_ba@mail.ru](mailto:ma_ba@mail.ru)

**Введение.** Одним из перспективных подходов к иммунотерапии рака является создание персонализированных противоопухолевых вакцин, направленных на усиление распознавания иммунной системой мутантных опухолевых неоантигенов.

**Цель исследования** — разработка биоинформатического подхода для анализа данных NGS-секвенирования образцов меланомы и нормальной ткани и предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10.

**Материалы и методы.** Секвенировали экзом и транскриптом опухолевой ткани меланомы B16F10 и нормальной ткани мышей линии C57Bl/6. Процедура секвенирования библиотек была произведена на платформе Illumina HiSeq 2500, анализ качества всех полученных библиотек был выполнен с помощью программ FastQC и MultiQC. Полученные файлы были использованы для дальнейшего биоинформатического анализа. Для поиска мутаций в образцах опухоли использовали программы GATK MuTect2 и Strelka.

**Результаты.** В образцах материала, полученного от нескольких мышей, проведен поиск соматических мутаций, присутствующих только в опухолях и отсутствующих в нормальной ткани, показано, что мутации в разных образцах опухоли значительно перекрываются, но не идентичны. Предсказание коротких пептидов, аффинных к главному комплексу гистосовместимости (МНС) мыши H-2, было проведено с использованием модели netMHCpan (версия 3.0), использующей глубокие искусственные нейронные сети. Для предсказания коротких пептидов, способных вызвать иммунный ответ, использовались мутации типа миссенс и фреймшифт. Для подтверждения, что мутированные аллели экспрессируются в опухоли, использовали транскриптомные данные. С помощью пайплайна Vaxrank были предсказаны иммуногенные пептиды длиной 25–27 aa, представлены параметры их синтезируемости и растворимости.

**Выводы.** Разработан биоинформатический подход для предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10.

**Ключевые слова:** биоинформатический анализ, неоантиген, противоопухолевая вакцина, меланома

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30

## IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC MUTANT NEOANTIGENS IN THE GENOME OF MURINE MELANOMA

V.S. Kosorukov<sup>1</sup>, M.A. Baryshnikova<sup>1</sup>, E.N. Kosobokova<sup>1</sup>, D. Yu. Yakovishina<sup>2</sup>, A.S. Ershova<sup>2</sup>, Yu.A. Pekov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia;  
24 Kashyrskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Ksivalue LLC; 30A Leninskiy Prospekt, Moscow 119049, Russia

**Introduction.** One of the promising approaches to cancer immunotherapy is the generation of personal antitumor vaccines that provides immune system recognition of mutant tumor neoantigens.

**The aim** of this study was to develop bioinformatic approaches for melanoma NGS-sequencing data analysis. On the basis of data obtained, to predict the peptides capable of inducing an immune response against B16F10 mouse melanoma.

**Materials and methods.** Exom and transcriptom of B16/F10 melanoma tumor tissue and normal tissue of C57BL/6 mice were sequenced. Library sequencing procedure was performed on Illumina HiSeq 2500 platform, quality analysis of all obtained libraries was performed using FastQC and MultiQC. The obtained files were used for further bioinformatics analysis. The GATK MuTect2 and Strelka were used for searching the mutations in tumor samples.

**Results.** Identification of somatic mutations specific for tumor was based on the analysis of few mice tumors. Here we show that mutations in different tumor samples significantly overlap, but are not identical. Prediction of short peptides affinity to the mouse main histocompatibility complex (MHC) H2 was performed using netMHCpan version 3.0. Mutations such as missense and frameshift were used to predict short peptides that could trigger an immune response. Transcriptome data confirm that mutated alleles are expressed in tumors. Vaxrank pipeline predicted immunogenic peptides with a length of 25–27. We also present the synthesis and solubility of these peptides.

**Conclusion.** A bioinformatic approach has been developed to predict peptides capable of increasing immune response of mouse melanoma B16/F10.

**Key words:** bioinformatic analysis, neoantigen, antitumor vaccine, melanoma

### Введение

Одним из быстро развивающихся подходов к лечению меланомы является иммунотерапия, к которой относится противоопухолевая вакциноterapia. Исследования последних лет показали, что опухолевые клетки имеют опухоль-специфические неоантигены, образующиеся как результат соматических мутаций, которые могут служить мишенью для клеток иммунной системы [1]. Такие неоантигены обладают высокой иммуногенностью, поскольку они экспрессируются только в опухолевых клетках и не экспрессируются в нормальных [2]. Благодаря развитию методов секвенирования нового поколения и биоинформатического анализа появилась возможность создания персонализированных противоопухолевых вакцин, направленных на усиление распознавания клетками иммунной системы мутантных опухолевых неоантигенов [3, 4].

Такие противоопухолевые вакцины представляют собой химически синтезированные неоантигенные пептиды, отобранные в результате биоинформатического прогнозирования высокоаффинного связывания мутантных неоантигенов с аутологичными молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), вызывающие активацию иммунного ответа [5].

**Цель исследования** — разработка биоинформатического подхода для анализа данных секвенирования нового поколения (NGS) образцов меланомы и нормальной ткани и предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышью меланомы B16F10.

Обзор методов прогнозирования возможности связывания пептидов с МНС показал, что большая часть существующих подходов решает задачу предсказания аффинности пептидов только к HLA-комплексу людей. В целом можно выделить 3 группы методов. К 1-й группе относятся SYFPEITHI и ProPred [6], основанные на статистическом анализе профилей выровненных последовательностей. Ко 2-й группе — методы, использующие скоринговые матрицы, в частности PSSM и RANKPEP [7]. RANKPEP реализует такой подход для человеческих и мышинных МНС, достигая точности порядка 80 %. К 3-й группе относятся методы машинного обучения. Наиболее совершенным и популярным из них является netMHCrap, использующий глубокие искусственные нейронные сети и обладающий высокой специфичностью и чувствительностью [8]. По этой причине именно этот метод был выбран в нашей работе для поиска пептидов, обладающих высокой аффинностью к МНС.

В основе метода лежит нейронная сеть с двумя полносвязными слоями, обученная на данных об аффинности более чем 180 тыс. пептидов к 172 молекулам МНС различных организмов (в частности, человека, нескольких приматов, свиней, крупного

рогатого скота и мышей). Таким образом, netMHCrap позиционируется как инструмент широкого спектра применения [9, 10]. Тем не менее многократное преобладание человеческих данных над мышинными в обучающей выборке может негативно отразиться на производительности метода при предсказании связывания пептидов с H2-комплексом. Это обстоятельство усугубляется тем, что МНС разных видов связываются с пептидами разной длины. Поскольку из всех версий netMHCrap только версия 3.0 напрямую моделирует длину пептида и сопровождается детальным анализом качества предсказания аффинности пептидов разной длины к H2-комплексу мышей, мы решили использовать именно эту версию, несмотря на то что последней на сегодняшний день является версия 4.0.

### Материалы и методы

В работе использовали мышей самок линии C57Bl/6 с подкожно перевитой меланомой B16F10, полученной из банка клеточных культур НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Для выделения ДНК и РНК у мышей удаляли опухоли, а в качестве образцов нормальной ткани использовали селезенки.

Выделение ДНК проводили с помощью набора DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) по модифицированному протоколу производителя, контроль качества полученной ДНК осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле. Выделение РНК проводили с помощью реагента ExtractRNA (Евроген), контроль качества полученной РНК был выполнен с помощью капиллярного электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Все полученные образцы ДНК и РНК были признаны пригодными для дальнейшей пробоподготовки. Подготовку библиотек и обогащение проводили с использованием набора SureSelect XT Mouse All Exon Kit (Agilent) согласно протоколу производителя. Контроль качества полученных библиотек фрагментов ДНК осуществляли на приборе LabChip GX Touch 24 по протоколу производителя. Процедуру секвенирования 10 библиотек проводили на платформе Illumina HiSeq 2500 с глубиной покрытия экзона не менее  $\times 100$ .

Из тотальной РНК синтезировали кДНК с использованием набора Mint-2 (Евроген) согласно протоколу производителя. Из полученной кДНК были приготовлены библиотеки с набором Qiaseq FX DNA Library kit (Qiagen) согласно протоколу производителя и проведен контроль качества полученных библиотек фрагментов кДНК на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Процедура секвенирования библиотек была проведена на платформе Illumina HiSeq 2500, 100PE с получением не менее 30 млн ридов на каждый

образец. Полученные FASTQ-файлы были использованы для дальнейшего биоинформатического анализа. Анализ качества всех полученных библиотек был выполнен с помощью программ FastQC и MultiQC.

Для поиска мутаций в образцах опухоли использовали две различные программы – GATK MuTect2 и Strelka. Для дальнейшей работы были использованы только мутации, предсказанные обеими программами.

Предсказание коротких пептидов, аффинных к МНС Н-2 мыши, было проведено с применением модели netMHCpan, использующей глубокие искусственные нейронные сети. Алгоритм netMHCpan обладает высокой специфичностью и чувствительностью (площадь под ROC кривой = 0,96), что подтверждается валидацией на экспериментальных данных [9].

На вход netMHCpan требует последовательности пептидов и аллель МНС. Интерфейс позволяет регулировать версию netMHCpan, длину последовательности, задавать множественные последовательности МНС, длину пептида и способ предсказания. Для наших целей использовались длины пептида 25 и 27. Важно отметить, что особенностью МНС-генов лабораторных чистых линий мышей является то, что набор аллелей и гаплотип для них predetermined, и поэтому (в отличие от человеческих HLA-генов) не требуют предварительного гаплотипирования. Гены *H2-K* и *H2-D* чистой линии C57BL/6 имеют гаплотип b – *H2-Kb* и *H2-Db*.

В работе был использован программный комплекс Vaxrank [11], который инкапсулирует предобработку данных и вызовы netMHCpan.

В пайплайне Vaxrank длина желаемого пептида передается как внешний параметр. Тем не менее в выводе присутствуют пептиды длины меньше заданной, что указывает на то, что предсказать пептид желаемой длины удастся не всегда. Основываясь на рекомендациях, предложенных в работах J.C. Castle, S. Kreiter и соавт. и A. Rubinsteyn, J. Kodysh и соавт., было решено использовать длины 25–27 aa [3, 12]. Дополнительно пайплайном производили расчет синтезируемости всех предложенных пептидов по нескольким параметрам и для каждого пептида приводили финальный рейтинг, по которому выполняется ранжирование пептидов.

Параметры синтезируемости, обрабатываемые в пайплайне Vaxrank:

- мера гидрофобности 7-мера на конце;
- максимальная мера гидрофобности по всем 7-мерам;
- число пролинов в C-конце;
- число цистеинов в C-конце;
- число аспарагинов в N-конце;
- число глутаминов, глутаминовых кислот и цистеинов в N-конце;

- число аспарагинпролиновых связей;
- общее число цистеинов в пептиде.

GRAVY-Score – мера гидрофобности боковых цепей пептида, образованная как сумма индексов гидрофобности каждого из остатков. Самые гидрофобные имеют самые большие значения (изолейцин (4,5) и валин (4,2)), а самые гидрофильные – самые отрицательные (аргинин (–4,5) и лизин (–3,9)) [13].

Дополнительно с помощью сервера, описанного в работе M. Hebditch и соавт. и доступного по ссылке: <https://www.protein-sol.manchester.ac.uk/>, была проведена оценка растворимости пептидов [14].

Соответствующие мутации были подтверждены методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

### Результаты и обсуждение

Для исследования экзоста и транскриптома нормальной ткани и опухоли у 6 мышей C57Bl/6 удалили селезенки и заранее подкожно перевитые опухоли меланомы B16F10. После секвенирования был проведен контроль качества полученных экзомных и транскриптомных библиотек, показавших, что данные секвенирования подходят для биоинформатического анализа.

Детекция соматических точечных мутаций является ключевым шагом в характеристике генома опухоли. Для поиска мутаций в образцах опухоли использовали 2 различные программы: Strelka и MuTect2.

Strelka представляет собой программу для детекции соматических вариантов и инделей на основе сравнения выровненных секвенированных прочтений парных образцов рака и нормы. Strelka основана на Байесовском подходе, где частоты аллелей в образце рака и нормы рассматриваются как непрерывные значения, при этом образцы нормы представлены как смесь мутаций в половых клетках и шума, а образцы рака представляют собой смесь нормального образца с раковыми клетками, содержащими соматические мутации. Более высокая точность алгоритма Strelka достигается за счет поиска инделей и перевыравнивания прочтений в контексте обоих образцов. Эта модель структурирована для учета любого уровня вариации частоты аллелей в образце опухоли без необходимости оценки чистоты образца [15].

В MuTect2 [16] для образцов рака оцениваются и сравниваются 2 модели: модель дикого типа M0, которая подразумевает, что все риды, не совпадающие с референсом, являются техническим артефактом, и мутационная модель Mf, подразумевающая, что аллельный вариант представлен с некоторой неизвестной частотой f. Логарифм отношения правдоподобия (LOD score) вычисляется для выбора более подходящей модели. В потенциальных сайтах мутаций (точки с высоким LOD score) модель M0 сравнивается с гетерозиготной моделью M0.5. Если M0 оказывается

Таблица 1. Количество общих и уникальных мутаций, найденных при сравнении образцов экзомов

Table 1. Common and unique mutations found when comparing exome samples

Сравниваемая пара образцов Compared samples		Мутации, уникальные для 1-го образца Unique mutations for the 1-st sample	Мутации, уникальные для 2-го образца Unique mutations for the 2-d sample	Мутации, общие для 2 образцов Common mutations for 2 samples
1	2	510	462	1473
1	3	454	501	1529
2	3	435	530	1500

предпочтительнее, чем M0.5, вариант считается соматической мутацией.

В работе M. Löwer и соавт. было показано, что в меланоме B16F10 тремя различными алгоритмами поиска соматических мутаций (GATK, SAMtools and SomaticSniper) было обнаружено 5338, 8672 и 8220 соответственно мутаций в экзонах [17]. Далее была проведена процедура фильтрации мутаций, в ходе которой были оставлены только точечные замены, встречающиеся во всех образцах меланомы и не встречающиеся во всех образцах нормы, при этом соответствующие участки в образцах нормы секвенированы с высоким качеством. После такой обработки было отобрано 4078 мутаций. При этом всеми тремя алгоритмами одновременно было найдено 33 % мутаций (1335 из 4078). Интересно, что в другой статье тех же авторов при анализе 2 реплик меланомы B16F10 тремя различными алгоритмами поиска соматических мутаций (GATK, SAMtools and SomaticSniper) было выявлено 908 соматических мутаций [18]. По-видимому, такие различия объясняются быстрым накоплением новых мутаций в опухоли или высокой гетерогенностью опухолевой ткани.

Нами был проведен поиск соматических мутаций, которые присутствуют только в образцах опухолей и не найдены в образцах нормальной ткани, при этом гены, несущие данные мутации, экспрессируются в образцах опухоли. В образце 1 было найдено 1983 мутации, в образце 2 – 1935 мутаций, в образце 3 – 2030 мутаций.

Сравнение найденных мутаций из различных образцов экзомов показало, что список мутаций, полученных при анализе различных образцов меланомы B16F10, значительно перекрывается, но не идентичен, как видно из табл. 1.

Предсказание коротких неоантигенных пептидов, аффинных к МНС H-2 мыши, было проведено с использованием модели netMHCrap. Для предсказания коротких пептидов использовали мутации типа миссенс и фреймшифт. Транскриптомные данные использовали для подтверждения, что мутированные аллели экспрессируются в опухоли. С помощью пайплайна Vaxrank были предсказаны пептиды длиной 25–27 аа, которые впоследствии были проранжиро-

ваны по внутренней метрике. Предсказание выполнялось отдельно для каждого из экспериментальных образцов, а затем полученные наборы пептидов были объединены. Из всего получившегося набора пептидов для последующего исследования были выделены пептиды, обладающие максимальным значением рейтинга (табл. 2). Для них представлены параметры синтезируемости, оцененные Vaxrank, и растворимости, оцененные с помощью сервера, описанного в работе M. Hebditch и соавт. [14].

В качестве положительного контроля выбраны пептиды, описанные в исследованиях J. C. Castle, S. Kreiter и соавт. [3, 19]. В этих работах мышей иммунизировали подкожно пептидами с адьювантом Poly (I : C), в результате показано, что наибольшую противоопухолевую активность проявили пептиды, содержащие мутации Tubb3 (G402A) и Kif18b (K739N). При иммунизации группы мышей пептидом, содержащим мутацию K739N в Kif18b, наблюдалась выживаемость 40 % мышей, в то время как в контрольной группе все мыши погибли в течение 44 дней.

Среди наших пептидов, выбранных для проверки, есть пептид, содержащий мутацию в гене *Pbk*. Он почти полностью совпадает с пептидом из работы S. Kreiter и соавт., кроме того, что не содержит 2 остатков (DS) на N-конце и, наоборот, содержит 2 остатка EK на C-конце. Из 21 пептида, исследованного в работе S. Kreiter, в наш список попали 8. Последовательности пептидов, выбранные в результате нашего исследования, отличаются 1–2 концевыми остатками, в 2 случаях – 4–5 остатками.

Полученные последовательности пептидов были переданы на многопоточный синтез и очистку.

### Заключение

В результате проведенной работы нами был разработан биоинформатический подход для предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10. Данные пептиды в дальнейшем будут использованы для создания пептидной неоантигенной вакцины против меланомы мыши B16F10.

Прототипом нашей работы послужили исследования J.C. Castle, A. Rubinsteyn, J. Kodysh, S. Kreiter и соавт. В работе J.C. Castle и соавт. было найдено 962 гена, содержащих мутации, ассоциированные с меланомой B16F10, из которых авторы отобрали 50 для верификации [3]. Из отображенных нами мутаций 14 пересекаются с 50 экспериментально изученными и 49 – с исходным списком из 962 генов. Сравнение на уровне последовательностей отображенных пептидов проводить нецелесообразно, поскольку в работе J.C. Castle и соавт. пептиды были сконструированы как 27-аминокислотные последовательности с центром в точке мутации, а в нашей работе выбор последовательности,

которая содержит мутацию и при этом имеет наибольшее сродство к комплексу МНС-I, осуществлялся с помощью программы NetMHCpan как шаг пайплайна Vaxrank.

Таким образом, несмотря на значительные различия в программах и подходах для поиска мутаций, в нашей работе и в исследовании J.C. Castle и соавт., где данные образцы были проанализированы впервые, полученные результаты пересекаются в 70 % (49 из 67) случаев с ранее полученными данными, что позволяет говорить о применимости предложенного подхода не только для поиска мутаций в образцах мышины меланомы, но и для поиска иммуногенных мутаций меланомы человека.

**Таблица 2.** Перечень отображенных пептидов, а также пептидов, которые могут быть использованы в качестве положительного контроля  
Table 2. Selected peptides, as well as those that can be used as a positive control

Ген Gene	Замена Substitution	Последовательность Sequence	Рейтинг Score
<i>Ctsd</i>	p. G403S	DVFIGSYYTVFDRDNNRV_S_FANAVVL*	105,82
<i>Sdcbp</i>	p. I219M	SSGHVGFIFKSGK_M_TSIVKDSSAARNG	49,72
<i>Dennd5a</i>	p. D1250A	PITAHMYE_A_VALIKDHTLVNSLIRVLQ	13,86
<i>Gm4951</i>	p. D267Y	FMFSLPNIT_Y_SVIEKRNFLRWKTWLE	12,98
<i>Herc2</i>	p. C4450F	GGLAGPDGTKSVFGQM_F_AKMSSFSPDS	9,98
<i>Enpp2</i>	p. P755Q	PEAKYDAFLVTNMV_Q_MYPAFKRVWTFYF	8,09
<i>Arpc1b</i>	p. S117F	WAPNENKFAVGSF_F_RVISICYFEQEND	6,57
<i>Olfir776</i>	p. D178A	CALNIIDHFSC_A_YFPILQLSCSDTRLL	6,05
<i>Aqp4</i>	p. L202W	GFSVAIGH_W_FAINYTGASMNPARSFGP	5,28
<i>Klhl28</i>	p. P110A	GTVFISQDTVESLL_A_AANLLQIKIVLK	5,23
<i>Ampd2</i>	p. Q666H	LSENISHGLLLRKAPVL_H_YLYLAQIG	5,19
<i>B3galt6</i>	p. R228L	LVHYLRIS_L_EYLRWHSEDVSLGTWLA	5,15
<i>Pcmd1</i>	p. P222L	LAVSFAPLVQ_L_SKNDNGTPDSVGLPPC	4,88
<i>Smc4</i>	p. D767N	SGGGSKVMRGRMGSSVI_N_EISVEEVNK	4,47
<i>2210408I21Rik</i>	p. D13A	DALQEYSHNSF_A_IQCLLNSFPDLEFK	4,44
<i>Lins1</i>	p. K154T	MRMLQNSD_T_LLSHMAAKCLASLIYFQL	3,89
<i>Pole</i>	p. L1847F	TLHNMMKK_F_FLQLIAEFKRLGSSVVYA	3,58
<i>Olfir706</i>	p. I174F	TVYTMYPFCMSQE_F_RHLLCEILPLLK	3,55
<i>Atp6v1h</i>	p. K147T	VHMAARIIA_T_LAAWGKELMEGSDLNYY	3,44
<i>Nsun2</i>	p. K138M	AWHTNLSRKILR_M_SPLLAKFHQFLVSE	3,32
<i>Pbk</i>	p. V145D	GSPFPAVILR_D_ALHMARGLKYLHQEK	3,09
<i>Pbk</i>	p. V145D	GSPFPAVILR_D_ALHMARGLKYLHQEK	3,09
<i>Nckipsd</i>	p. K492N	MQTDTDHQ_N_LCYSAIVLAMVFSMGEA	2,86
<i>Hpd1</i>	p. P144A	AGYRGSFL_A_GFRPLPCTPGPGWVSHVD	2,81

Окончание табл. 2

The end of the table 2

Ген Gene	Замена Substitution	Последовательность Sequence	Рейтинг Score
<i>Vps52</i>	p. H448R	YDAIAVFLCI_R_IVLRFNRNIAAKRDVPA	2,62
<i>Poll</i>	p. H509N	ALLYFTGSA_N_FNRSMRALAKTKGMSLS	2,51
<i>Orc2</i>	p. F278V	RVDQKTLHNLLRK_V_VPSFSAEIERLNQ	2,51
<i>3110043021Rik</i>	p. Q297H	VQGLLKDATGSFVLPFR_H_VMYAPYPTT	2,39
<i>Apbb1</i>	p. C654Y	ASLSEAVQAA_Y_MLRQKCLDARSQTST	2,19
<i>Arsj</i>	p. R509M	FNITADPYERVDLSS_M_YPGIVKLLRR	2,17
<i>Krt75</i>	p. G56A	GRISGIGS_A_FGSRSLYNLGGTRRVSIG	2,09
<i>Mrm2</i>	p. R134T	TFLCPADVTDTP_T_TFQKILELLPSRRAD	1,87
<i>2810474019Rik</i>	p. N687T	SYNSQIAEIF_T_SVQTEPQKPSPNQVID	1,73
<i>Arfgef2</i>	p. E538V	VVDIYVNYDCDLNAANIF_V_RLVNDL	1,72
<i>Gm7298</i>	p. C48R	YTETPEKI_R_LHLYHLNETVITIASIVS	1,45
<i>Angel2</i>	p. D166N	RNV DSTCEDREDKF_N_FSVMSYNILSQD	1,40
<i>St6galnac3</i>	p. D30E	LLAMRLVN_E_ATFPLLLNCFGQPKTKW	1,34
<i>Cd55</i>	p. D254A	SDSYTYSQVVITYSC_A_KGFILVGNASIY	1,31
<i>Wipi2</i>	p. T304A	PSQVTEMFNQGRAFA_A_VRLPFCGHKNI	1,30
<i>Adgrv1</i>	p. Y5165F	KITTIP_F_TTEVFAPVTEIVTVAIP	1,17
<i>Taar9</i>	p. C190W	NEEGIEELVVALTCVGG_W_QAPLNQNWV	1,14
<b>Положительный контроль</b> Positive control			
<i>Tpo3</i>	p. G504A	VDRNPQFLDPVL_A_YLMKGLCEKPLASA	4,16
<i>Actn4</i>	p. F855V	SGLVTFQAFID_V_MSRETTDITDADQVI	6,59
<i>Tm9sf3</i>	p. Y382H	PAMVCGTAFFINFIAIY_H_HASRAIPFG	2,11
<i>Ppp1r7</i>	p. L170P	RNIEGIDKLTQLKK_P_FLVNNKINKIEN	0,00
<i>Mthfd11</i>	p. F294V	WIPSGTTILNCFHD_V_LSGKLSGGSPGV	0,42
<i>Tubb3</i>	p. G402A	FRRKAFLHWYTGE_A_MDEMEFTEAESNM	0,00
<i>Sema3b</i>	p. L663V	LRRVLHV_V_SAAQAERLARAEEAAPA	0,00
<i>Kif18b</i>	p. K739N	PSKPSFQEFVDWE_N_VSPELNSTDQPFL	NA**
<i>Obsl1</i>	p. T1764M	REGVELCPGNKYEMRRRHGTTHSLVIHD	NA
<i>Sema3b</i>	L663V	GFSQPLRRVLHVVSAAQAERLARAEE	NA
<i>Tm9sf3</i>	Y382H	CGTAFFINFIAIYHNSRAIPFGTMVA	NA

\*«\_» – несинонимичная замена аминокислоты; \*\*NA – пептид не был предсказан при нашем анализе.

\*«\_» – nonsynonymous substitution of the amino acid; \*\*NA – the peptide was not predicted in our analysis.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Барышникова М.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(2):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-7-2-6-14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(2):5–14. (In Russ.)].
- Robbins P.F., El-Gamil M., Li Y.F. et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:1185–92. DOI: 10.1084/jem.183.3.1185.
- Castle J.C., Kreiter S., Diekmann J. et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 2012;75(5):1081–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3722.
- Robbins P.F., Lu Y.C., El-Gamil M. et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 2013;19(6):747–52. DOI: 10.1038/nm.3161.
- Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547:217–21. DOI: 10.1038/nature22991.
- Singh H., Raghava G.P. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *Bioinformatics* 2003;19(8): 1009–14. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg108.
- Reche P.A., Glutting J.P. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics* 2004;56(6):405–19. DOI: 10.1007/s00251-004-0709-7.
- McGranahan N., Furness A.J., Rosenthal R. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 2016;351(6280):1463–9. DOI: 10.1126/science.aaf1490.
- Jurtz V., Paul S., Andreatta M. et al. NetMHCpan-4.0: Improved peptide-MHC class I interaction predictions integrating eluted ligand and peptide binding affinity data. *J Immunol* 2017;199(9): 3360–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1700893.
- Lundegaard C., Lamberth K., Hamdahl M. et al. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. *Nucleic Acids Res* 2008;36(Web Server issue):509–12. DOI: 10.1093/nar/gkn202.
- Rubinsteyn A., Hodes I., Kodysh J., Hammerbacher J. Vaxrank: A computational tool for designing personalized cancer vaccines. available at: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/10/18/142919>
- Rubinsteyn A., Kodysh J., Hodes I. et al. Computational pipeline for the PGV-001 neoantigen vaccine trial. *Front Immunol* 2018;8: 1807. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01807.
- Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 1982;157(1):105–32. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- Hebdtich M., Carballo-Amador M.A., Charonis S. et al. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics* 2017;33(19):3098–100. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx345.
- Saunders C.T., Wong W.S., Swamy S. et al. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics* 2012;28(14):1811–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts271.
- Cibulskis K., Lawrence M.S., Carter S.L. et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 2013;31(3):213–9. DOI: 10.1038/nbt.2514.
- Lower M., Renard B.Y., de Graaf J. et al. Confidence-based somatic mutation evaluation and prioritization. *PLoS Comput Biol* 2012;8(9):1002714. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002714.
- Castle J.C., Lower M., Boegel S. et al. Mutated tumor alleles are expressed according to their DNA frequency. *Sci Rep* 2014;4:4743. DOI: 10.1038/srep04743.
- Kreiter S., Vormehr M., van de Roemer N. et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 2015;520(7549):692–6. DOI: 10.1038/nature14426.

**Вклад авторов**

В.С. Косоруков: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи;

М.А. Барышникова: концепция и дизайн, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;

Е.Н. Кособокова: сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

Д.Ю. Яковичина: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;

А.С. Ершова: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;

Ю.А. Пеков: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных.

**Author's contributions**

V.S. Kosorukov: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article, approval of the final version;

M.A. Baryshnikova: concept and design, data collection and processing, article preparation;

E.N. Kosobokova: data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article;

D.Yu. Yakovishina: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;

A.S. Ershova: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;

Yu.A. Pekov: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

В.С. Косоруков/V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

М.А. Барышникова/M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

Е.Н. Кособокова/E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>

Д.Ю. Яковичина/D.Yu. Yakovishina: <https://orcid.org/0000-0003-1557-7593>

А.С. Ершова/A.S. Ershova: <https://orcid.org/0000-0002-1014-7677>

Ю.А. Пеков/Yu.A. Pekov: <https://orcid.org/0000-0001-9285-0309>

**Конфликт интересов.** Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках экспериментальной научной разработки № АААА-А18-118032290146-5.  
**Financing.** The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the experimental scientific development No АААА-А18-118032290146-5.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.  
**Compliance with principles of bioethics.** The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 22.07.2019. Принята в печать: 12.08.2019.  
Article received: 22.07.2019. Accepted for publication: 12.08.2019.