

©Коллектив авторов

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПЕПТИДА, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩЕГО С CTLA-4

С.В. Подлесных^{1}, В.В. Лампатов², А.И. Хлебников³, А.И. Шаповал^{1,4}*

¹Российско-Американский противораковый центр, Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61; *эл. почта: step-uch@mail.ru

²НИИ Биологической медицины, Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30

⁴Center for Innovations in Medicine, Biodesign Institute, Arizona State University, 1001 S. McAllister Ave., 85281 AZ, Tempe, USA

Современные достижения в изучении свойств молекул контроля иммунитета (так называемых иммунологических контрольных точек – “чекпойнтов”) CTLA-4, PD-1, PD-L1 открыли новые возможности для эффективной терапии онкологических заболеваний с помощью моноклональных антител. Однако препараты антител имеют ряд ограничений, что актуализирует поиск низкомолекулярных соединений, способных регулировать (блокировать) функции молекул, ингибирующих иммунный ответ. В настоящей работе представлены результаты молекулярного докинга и экспериментального изучения специфичности взаимодействия синтетических пептидов с молекулой CTLA-4. С помощью математического моделирования было показано, что один из исследуемых пептидов взаимодействует с петлёй ⁹⁹MYPPPY¹⁰⁴ белка CTLA-4 и потенциально может блокировать взаимодействие CTLA-4 рецептора с его природным лигандом B7-1. Проведена экспериментальная оценка специфичности взаимодействия выявленного пептида с рекомбинантными химерными белками CTLA-4 и B7-1. Полученный синтетический пептид может быть использован для разработки иммуномодулирующих препаратов для терапии онкологических или аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: пептиды; иммунологические контрольные точки; иммунный ответ; микрочипы; синтетические пептиды; иммунотерапия

DOI: 10.18097/PBMC20206602156

ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы лигандов семейства B7, представленные на поверхности Т-лимфоцитов, доставляют как стимулирующие, так и ингибирующие сигналы, которые обеспечивают активацию или супрессию иммунного ответа соответственно [1]. К ингибирующим рецепторам Т-клеток относится рецептор CTLA-4 (CD152), взаимодействующий с B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86) лигандами, а также рецептор PD-1 (CD279), взаимодействующий с PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC) лигандами. Данные молекулы относятся к молекулам контроля иммунитета (МКИ) (также известными как иммунологические контрольные точки – “чекпойнты”, от англ. immune checkpoints) [1-4]. Результаты клинических исследований показали, что инъекция моноклональных антител (МАТ), блокирующих МКИ, такие как CTLA-4, PD-1 и PD-L1, усиливает противоопухолевый иммунитет и приводит к отторжению опухолей [4-6]. Однако побочные эффекты и стоимость производства МАТ для терапии ограничивают их широкое клиническое применение. Низкомолекулярные агенты, такие как пептиды, блокирующие МКИ, могут решить некоторые проблемы, связанные с применением МАТ для терапии онкологических заболеваний [7, 8]. В последние годы был достигнут значительный

прогресс в развитии терапевтических пептидов, что связано с увеличением их стабильности, специфичности, а также со снижением стоимости их производства. В настоящей работе проведена оценка взаимодействия двух синтетических пептидов с молекулой CTLA-4. Данные пептиды выявлены с помощью микрочипов, содержащих 330034 пептида [9].

Согласно литературным данным, аминокислотная последовательность ⁹⁹MYPPPY¹⁰⁴ молекулы CTLA-4, локализованная в области контакта лиганд/рецептора B7-1/CTLA-4, является наиболее важной для взаимодействия между структурами этих белковых молекул [10]. Учитывая этот факт, с помощью 3D-моделирования мы исследовали особенности взаимодействия выявленного экспериментального пептида p346 с аминокислотной петлей ⁹⁹MYPPPY¹⁰⁴. В данной работе специфичность взаимодействия этого пептида с белком CTLA-4 подтверждена серией экспериментов с использованием иммуоферментного анализа (ИФА). Пептид p346, представленный в данной работе, является лидирующей молекулой для разработки иммуностимулирующих препаратов, регулирующих (блокирующих) взаимодействие CTLA-4 с B7-1, которые потенциально могут быть использованы для иммунотерапии онкологических или аутоиммунных заболеваний.

МЕТОДИКА

Для проведения 3D-моделирования были использованы структуры молекул рецептора CTLA-4 и лиганда B7-1/CD80 отдельно и в комплексе, представленные в базе данных Protein Data Bank (PDB). Структура комплекса B7-1/CTLA-4 была загружена из PDB (код 1I8L). Подструктура, содержащая белок CTLA-4, была экспортирована из загруженного файла и отправлена на сервер CABS-dock (protein-peptide docking software <http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock/>) [11]. При выполнении моделирования была использована стратегия “слепого” докинга без указания конкретного сайта связывания в молекуле CTLA-4: на сервер загружали только структуру белка и аминокислотную последовательность пептида; опциональные настройки поиска не применялись. Наилучшая конформация пептида p346 в комплексе с молекулой CTLA-4, полученная в качестве выходных данных с сервера CABS-dock, была импортирована в программу Molegro Virtual Docker (MVD) (“Molegro ApS”, Дания) для дальнейшего анализа и визуализации. С помощью инструмента “Ligand Energy Inspector”, входящего в состав программы MVD, оценивали величину Docking Score (S_{tot}), отражающую степень взаимодействия пептидов с молекулой CTLA-4, а также вклад в эту величину (S_p), вносимый только аминокислотной последовательностью ⁹⁹MYPPRY¹⁰⁴ петли. При вычислении S_{tot} и S_p была использована скор-функция MolDock [12].

При выполнении экспериментальной работы использовали коммерческие наборы рекомбинантных химерных белков иммунорегуляторных молекул человека – CTLA-4Fc, B7-1/CD80Fc (“R&D Systems”, США). В данной работе для приготовления основных рабочих растворов использовали фосфатно-солевой буфер (PBS) “Биолот” (Россия), Твин-20 “Helicon” (Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA) “Amresco” (США). Высокоочищенную апиrogenную деионизованную воду для инъекций получали на установке водоподготовки серии “УВОИ-МФ-1812” (Россия). Пептиды, используемые нами в данной работе, были выявлены на микрочипах, содержащих 24 идентичных микроэррея, каждый с 330034 пептидами со случайной аминокислотной последовательностью, по протоколу, описанному ранее [9]. Пептиды, используемые в данной работе, с аминокислотными последовательностями YDPEYRNFWGCG (p346) и EGLNRPSGGCG (p333) синтезировали в “Альфа-Органика” (Россия) с использованием методов классического синтеза пептидов в растворе. Полученные лиофилизированные пептиды растворяли в PBS (pH 7,3) и хранили при 4°C.

Специфичность связывания выявленных пептидов с молекулами CTLA-4, B7-1 определяли методом ИФА. С целью детекции образующихся “белок-пептидных” комплексов, использовали рекомбинантные белки CTLA-4Fc, B7-1/CD80Fc (“R&D Systems”), содержащие Fc-фрагменты иммуноглобулинов человека. Для определения связывания рекомбинантного белка использовали конъюгат вторичных моноклональных антител против IgG1 человека (Fc-специфические)

с пероксидазой хрена (“Invitrogen”, США). Перед началом работы 96-луночные планшеты Costar (“Corning”, США) для надежной сорбции пептидов были обработаны глутаровым альдегидом (0,125%) в объеме 200 мкл/лунка, инкубация составляла 2 ч при комнатной температуре. После инкубации планшет промывали водой, остатки воды вытряхивали, просушивали планшет. Далее в лунках этих 96-луночных планшетов были сорбированы синтетические пептиды (100 мкл/лунка) с концентрацией 1 мкг/мл в сорбционном PBS при 4°C в течение ночи. После этого производили блокировку планшетов в течение 2 ч при комнатной температуре с раствором PBS, содержащим 2% BSA и 0,05% Твин-20, в каждую лунку планшета добавляли 200 мкл раствора. Затем вносили разные концентрации исследуемых образцов CTLA4Fc и B7-1/CD80Fc (начальная концентрация 5 мкг/мл) в объеме 100 мкл на лунку (две лунки на каждый образец). Разведения образцов рекомбинантного белка готовили в блокирующем растворе, содержащем 1% BSA. 96-луночные планшеты с образцами инкубировали 1 ч при 37°C. По окончании инкубации проводили трёхкратную отмывку (250 мкл/лунка) в автоматическом вошере (“BioTek”, Россия) с PBST (раствор PBS, содержащий 0,05% Твин-20). Затем в лунки планшета вносили 100 мкл/лунку раствора конъюгата антител с пероксидазой хрена (1:10000). После инкубации в течение 1 ч планшеты отмывали 6 раз раствором PBST и добавляли (50 мкл/лунку) раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Планшеты выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 1-5 мин. Остановку реакции проводили внесением во все лунки планшета 50 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность реакции фиксировали стандартно (при 450 нм) на фотометре для планшетов, модель iMark (“Bio-Rad”, США).

Специфичность связывания рекомбинантного белка лиганда B7-1, моноклональных антител против CTLA-4 человека (анти-CTLA-4) с молекулами CTLA-4Fc оценивали аналогичным образом, используя ИФА. Рекомбинантный белок B7-1/CD80, не содержащий Fc-фрагмента (“R&D Systems”), был использован для сорбирования в лунки планшета. Образцы B7-1 и анти-CTLA-4 (“R&D Systems”) были использованы в концентрации 8 мкг/мл в PBS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее с помощью пептидных микрочипов мы выявили более 350 пептидов, которые специфически взаимодействуют с рекомбинантными химерными белками B7-1Fc, B7-2Fc и CTLA-4Fc [9]. 19 пептидов, представленных на микрочипах, специфически взаимодействовали с рекомбинантным белком CTLA-4Fc. Статистическими методами были выбраны 8 пептидов, которые показали максимальный уровень взаимодействия (флуоресценции) с молекулой CTLA-4. Данные пептиды, а также 2 контрольных пептида, которые не взаимодействовали с CTLA-4Fc, были синтезированы для экспериментальной оценки.

Среди всех пептидов был отобран пептид YDPEYRNFWGCG (с номером p346), который показал наиболее воспроизводимые результаты в серии экспериментов. Данный синтетический пептид (1,5 кДа) содержит 12 аминокислотных остатков, расчетные значения индекса GRAVY (-1,30) характеризуют этот пептид как гидрофильный. Контрольный пептид EGLNRPSGGCG с номером p333, не взаимодействующий с CTLA-4Fc, имеет аналогичные физико-химические свойства.

На рисунке 1 представлены результаты молекулярного докинга для пептида p346.

Структура комплекса B7-1/CTLA-4 была загружена из PDB (код 1I8L). Подструктура, содержащая белок CTLA-4, была экспортирована из загруженного файла и отправлена на сервер CABS-dock. Нами использован вычислительный

подход, реализованный на сервере CABS-dock [11] и предназначенный для докинга пептидов к белкам с помощью методологии, не требующей предварительных данных о расположении сайта связывания на белковой макромолекуле. При этом, в полной мере учитывается конформационная подвижность пептида и частично подвижность белковой макромолекулы [11], что допускает проведение докинга без специальной подготовки (предоптимизации) кристаллической структуры макромолекулы.

Обнаружено, что наилучшее расположение молекулы высокоактивного пептида p346 находится вблизи петли ⁹⁹MYPPPY¹⁰⁴ макромолекулы CTLA-4. При этом пептид должен препятствовать взаимодействию молекулы рецептора CTLA-4 с лигандом B7-1 и формированию областей

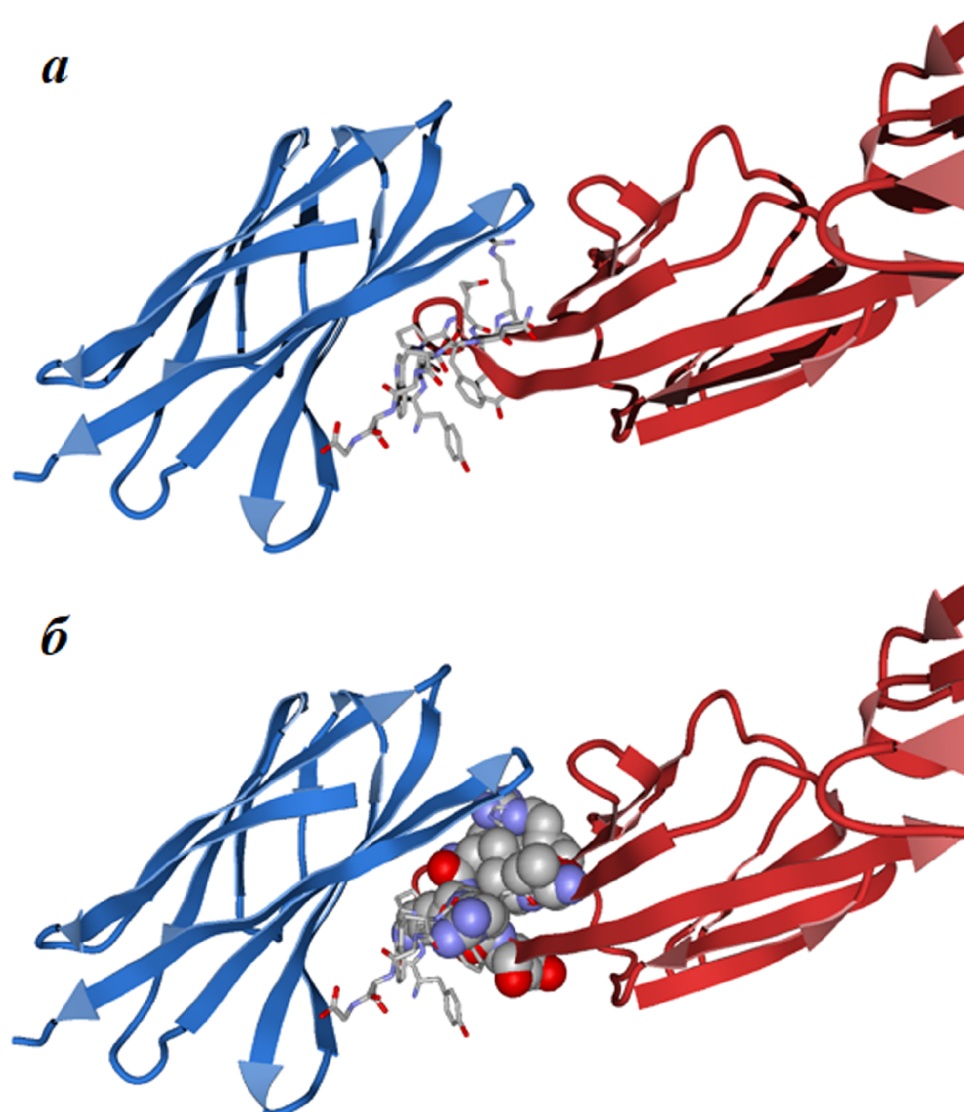


Рисунок 1. Модель взаимодействия пептида p346 с петлёй ⁹⁹MYPPPY¹⁰⁴ белка CTLA-4. С использованием сервера CABS-dock был выполнен докинг p346 к белку CTLA-4 (синяя лента) в составе комплекса B7-1/CTLA-4 (структура 1I8L из Protein Data Bank). Взаимодействие пептида p346 с макромолекулой B7-1 при докинге не учитывалось (а). Найденная наилучшая конформация пептида (цилиндры) занимает область пространства, совпадающую с участком взаимодействия белков CTLA-4 (синяя лента) и B7-1 (красная лента). Аминокислотные остатки B7-1, находящиеся в состоянии “клéша” (препятствия) с p346, показаны в виде шаров в нижней части рисунка (б). Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

контакта, наблюдаемого в PDB-структуре 1I8L [10]. Действительно, если к комплексу CTLA-4/p346 пристыковать макромолекулу B7-1 в той же ориентации, которую она занимала в структуре 1I8L, то наблюдается заметное наложение B7-1 на пептид (рис. 1а,б). Семь аминокислотных остатков белка B7-1, расположенных в пределах 1 Å от конформации пептида p346, считались находящимися в состоянии “кляша” (препятствия) с пептидом (рис. 1б), что может обуславливать блокаду взаимодействия рецептора CTLA-4 с лигандом B7-1.

Докинг неактивного пептида p333 показывает, что его наилучшее расположение на поверхности CTLA-4 находится вдали от аминокислотной последовательности $^{99}\text{MYPPPY}^{104}$. Так, несмотря на близость величины S_{tot} для пептидов p333 и p346 (рис. 2а), вклад S_p аминокислотных остатков петли $^{99}\text{MYPPPY}^{104}$ в эту величину для p333 гораздо ниже, чем для p346 (рис. 2б). Кроме того, обратная пристыковка лиганда B7-1 к комплексу CTLA-4/p333 показывает, что лишь два остатка B7-1 оказываются в состоянии “кляша” (препятствия) с пептидом, что предполагает потенциально низкую биологическую

активность и(или) слабое взаимодействие пептида p333 с CTLA-4.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу специфичности взаимодействия пептида p346 с петлей $^{99}\text{MYPPPY}^{104}$, которое играет ключевую роль в связывании CTLA-4 и B7-1 [10]. Таким образом, данный пептид может блокировать взаимодействие рецептора CTLA-4 и лиганда B7-1.

Далее синтетические пептиды были исследованы методом ИФА на способность взаимодействия с рекомбинантным химерным белком CTLA-4Fc. Для этого сначала была проверена специфичность взаимодействия рекомбинантного химерного белка CTLA-4Fc рекомбинантным белком B7-1, а также с МАТ против CTLA-4 человека. Данные, представленные на рисунке 3а, показывают, что рекомбинантный химерный белок CTLA-4Fc специфически взаимодействует с рекомбинантным белком B7-1 и антителами против белка CTLA-4 человека. Более высокий уровень взаимодействия рекомбинантного белка CTLA-4Fc с МАТ против CTLA-4 можно объяснить более высокой аффинностью антител в сравнении с рекомбинантным белком B7-1.

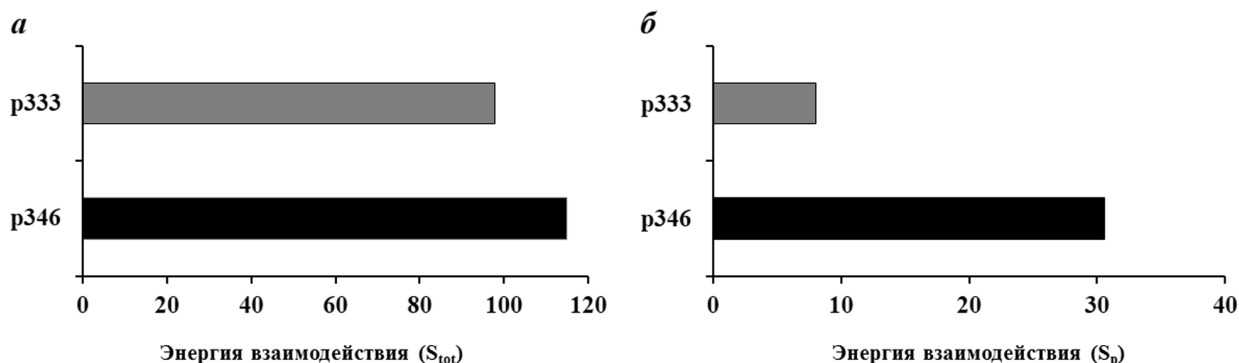


Рисунок 2. Оценка степени взаимодействия p346 пептида с белком CTLA-4 и с петлей $^{99}\text{MYPPPY}^{104}$. (а) Общая величина Docking Score (оценка стыковки) для взаимодействия пептид-белок (S_{tot}); (б) вклад (S_p) в величину Docking Score, приходящийся на взаимодействие с петлей $^{99}\text{MYPPPY}^{104}$ молекулы рецептора CTLA-4.

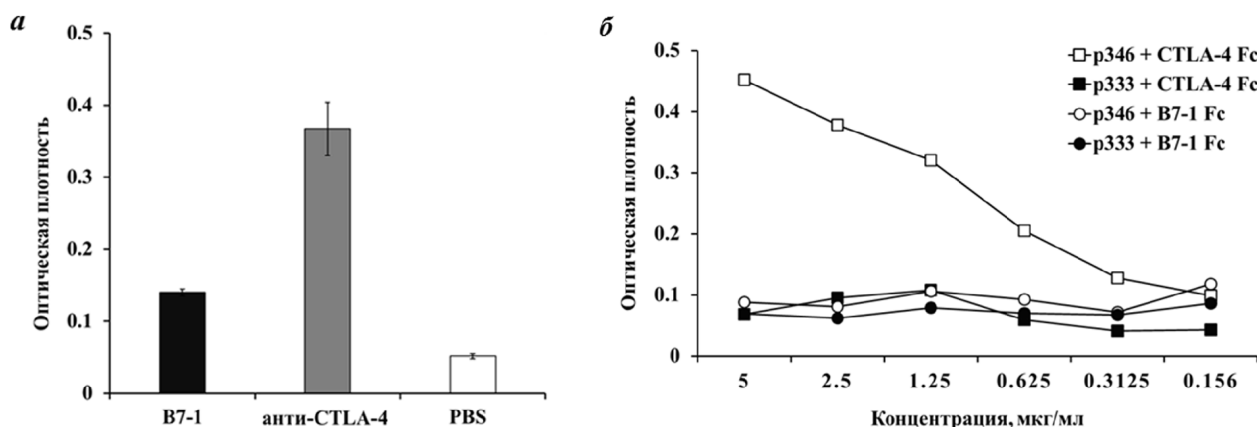


Рисунок 3. Взаимодействие CTLA-4Fc с лигандом, антителами и синтетическим пептидом. (а) Рекомбинантный белок B7-1 (8 мкг/мл) и анти-CTLA-4 МАТ (8 мкг/мл) были сорбированы (иммобилизованы) на 96-луночных планшетах. Рекомбинантный химерный белок CTLA-4Fc в концентрации 5 мкг/мл добавляли в лунки. Взаимодействие CTLA-4Fc с рекомбинантным белком B7-1 и антителами против CTLA-4 определяли с помощью МАТ против Fc части иммуноглобулина человека, конъюгированного пероксидазой хрена. В качестве контроля использовали лунки без белков (PBS); (б) синтетические пептиды p346 и p333 (контроль) были сорбированы (иммобилизованы) на 96-луночных планшетах в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный химерный белок CTLA-4Fc в концентрации 5 мкг/мл добавляли в “стартовые” лунки, с последующим разведением до 0,156 мкг/мл. Взаимодействие CTLA-4Fc с синтетическими пептидами определяли с помощью МАТ аналогично.

Следующим шагом данного исследования было определение специфичности взаимодействия пептида р346 с рекомбинантным химерным белком CTLA-4Fc. Для данных экспериментов были использованы 2 синтезированных пептида – “экспериментальный” р346, который взаимодействовал с CTLA-4Fc при тестировании микрочипов [9], и “контрольный” р333 пептид, который не взаимодействовал с CTLA-4Fc в экспериментах с микрочипами. Из данных, представленных на рисунке 3б, видно, что пептиды р346 и р333 не взаимодействуют с рекомбинантным белком-лигандом В7-1Fc. Однако отмечается высокий уровень специфического взаимодействия CTLA-4Fc с пептидом р346. CTLA-4Fc не взаимодействует с контрольным р333 пептидом. Следует отметить, что взаимодействие CTLA-4 с р346 пептидом имеет дозозависимый характер. Важно заметить, что Fc часть рекомбинантного CTLA-4Fc не участвует во взаимодействии с р346 пептидом, так как в молекуле белка В7-1Fc имеется та же аминокислотная последовательность Fc, и эта Fc-часть не связывается с данным пептидом.

Таким образом, в ходе данной работы было показано, что полученный синтетический пептид р346 может взаимодействовать с MYPPPY петлей CTLA-4, которая отвечает за связывание CTLA-4 рецептора с В7-1 лигандом. Энергия взаимодействия р346 пептида с петлей MYPPPY CTLA-4 значительно выше, чем у контрольного пептида р333, что говорит о специфичности взаимодействия р346 пептида с CTLA-4. Экспериментальные данные, полученные с помощью ИФА, демонстрируют и подтверждают специфичность взаимодействия молекул CTLA-4 и р346 пептида. Пептид р346, представленный в данной работе, является лидирующей молекулой для разработки иммуностимулирующих препаратов, которые могут регулировать/предотвращать связывание лигандов В7-1 (CD80) и, возможно, В7-2 (CD86) с ингибирующим рецептором CTLA-4, и тем самым может усиливать иммунный ответ. Однако иммуномодулирующие свойства р346 пептида требуют подтверждения *in vitro* и *in vivo*. Синтетические пептиды, способные блокировать точки контроля иммунного ответа, могут быть использованы, вместо МАТ для иммунотерапии аутоиммунных и онкологических заболеваний. Пептиды, по сравнению с МАТ, обладают рядом преимуществ, включая малые размеры, обеспечивающие более эффективное проникновения в ткани или опухоли, низкую иммуногенность, позволяющую проводить неограниченное количество инъекций, относительную простоту химического синтеза, снижающую стоимость препарата. Описанная в данной статье стратегия может быть использована для поиска пептидов взаимодействующими с другими молекулами, регулирующими иммунный ответ, например, PD-1, PD-L1 и PD-L2, В7-Н3 (CD276), В7-Н4, В7-Н5 (VISTA) и другие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№17-04-00321 и №17-54-33003), государственного задания Минобрнауки Российской Федерации (№6.3892.2017/4.6.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шаповал А.И., Шаповал С.П., Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н. (2019) Биоорганическая химия, **45**, 348-364. [Chapoval A.I., Chapoval S.P., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N. (2019) Russ. J. Bioorgan. Chem., **45**, 348-364.]
2. Xu F., Jin T., Zhu Y. (2018) J. Exp. Clin. Cancer Res., **37**, DOI: 10.1186/s13046-018-0777-4
3. Zhang H., Dutta P., Liu J., Sabri N., Song Y., Li W.X., Li J. (2019) J. Cell. Mol. Med., **23**, 535-542.
4. Sharma P., Allison J.P. (2015) Science, **348**, 56-61.
5. Шаповал А.И., Подлесных С.В., Колосова Е.А., Щербаков Д.Н. (2017) Росс. онкол. журнал, **22**, 175-179. [Chapoval A.I., Podlesnykh S.V., Kolosova E.A., Shcherbakov D.N. (2017) Russ. J. Oncol., **22**, 175-179.]
6. Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. (1994) Immunity, **1**, 405-413.
7. Wolchok J.D., Hoos A., O'Day S., Weber J.S., Hamid O., Lebbé C., Maio M., Binder M., Bohnsack O., Nichol G., Humphrey R., Hodi F.S. (2009) Clin. Cancer Res., **15**, 7412-7420.
8. Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R. et al. (2012) N. Engl. J. Med., **366**, 2443-2454.
9. Подлесных С.В., Шаньшин Д.В., Колосова Е.А., Мурашкин Д.Е., Шапрова О.Н., Щербаков Д.Н., Шаповал А.И. (2018) Биоорганическая химия, **44**, 138-145. [Podlesnykh S.V., Shanshin D.V., Kolosova E.A., Murashkin D.E., Shapova O.N., Shcherbakov D.N., Chapoval A.I. (2018) Russ. J. Bioorgan. Chem., **44**, 150-157.]
10. Peach R.J., Bajorath J., Brady W., Leytze G., Greene J., Naemura J., Linsley P.S. (1994) J. Exp. Med., **180**, 2049-2058.
11. Kurcinski M., Jamroz M., Blaszczyk M., Kolinski A., Kmiecik S. (2015) Nucleic Acids Res., **43**, W419-W424.
12. Thomsen R., Christensen M.H. (2006) J. Med. Chem., **49**, 3315-3321.

Поступила в редакцию: 19. 11. 2019.
После доработки: 28. 01. 2020.
Принята к печати: 24. 03. 2020.

**MOLECULAR DOCKING STUDY AND EXPERIMENTAL EVALUATION
OF POTENTIAL CTLA-4 BINDING PEPTIDES**

S.V. Podlesnykh^{1}, V.V. Lampatov², A.I. Khlebnikov³, A.I. Chapoval^{1,4}*

¹Russian-American Anti-Cancer Center, Altai State University,
61 Lenina ave., Barnaul, 656049 Russia; *e-mail: step-uch@mail.ru

²Research institute of Biological Medicine, Altai State University,
61 Lenina ave., Barnaul, 656049 Russia

³National Research Tomsk Polytechnic University,
30 Lenina ave., Tomsk, 634050 Russia

⁴Center for Innovations in Medicine, Biodesign Institute, Arizona State University,
1001 S. McAllister ave., 85281 AZ, Tempe, USA

Current advances in research of immune checkpoints CTLA-4, PD-1, PD-L1, opened new possibilities for effective cancer immunotherapy using monoclonal antibodies. However, antibodies have a number of limitations for clinical use, which provides a basis for the search for low molecular weight compounds capable of regulating (blocking) molecules that inhibit the immune response. This paper presents the results of molecular docking and evaluation of synthetic peptide interaction with a CTLA-4 molecule. Using mathematical modeling, it was shown that peptides interacted with the ⁹⁹MYPPPY¹⁰⁴ loop of the CTLA-4 protein and could potentially block the interaction of the CTLA-4 receptor with its natural ligand B7-1. The specificity of the interaction between the identified peptide and recombinant chimeric CTLA-4 protein was evaluated. The detected synthetic peptide can be used for the development of immunomodulatory drugs for therapy of cancer or autoimmune diseases.

Key words: peptides; immunological checkpoints; immune response; microarray; synthetic peptides; immunotherapy; immunomodulation

Funding. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (No. 17-04-00321 and 17-54-33003), the State plan of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (No. 6.3892.2017/4.6.).

Received: 19.11.2019, revised: 28.01.2020, accepted: 24.03.2020.