



УДК 577.25

РЕЦЕПТОРЫ СЕМЕЙСТВА Eph КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ

© 2012 г. С. А. Зозуля*,#, И. П. Удовиченко**,***

*КемДив, Инк., 6605 Нэнси Ридж Драйв, Сан-Диего, Калифорния 92121, США

**Филиал Института биоорганической химии РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Пущино

***Пуцинский государственный университет, г. Пущино

Поступила в редакцию 18.01.2011 г. Принята к печати 02.04.2011 г.

Антиангиогенная терапия является сегодня общепринятым и быстро развивающимся подходом в онкологии и других патологиях, сопряженных с процессами aberrантной неоваскуляризации. Известные ограничения существующих клинических препаратов, подавляющих активность сосудистого эндотелиального фактора роста и его рецепторов, диктуют необходимость поиска и экспериментального подтверждения дополнительных молекулярных мишеней в ангиогенезе. В статье дается краткий обзор биологических функций семейства рецепторных тирозинкиназ Eph и их лигандов – эфринов в норме и патологии и обсуждятся подходы к разработке терапевтических препаратов с анти- и проангиогенной и противоопухолевой активностью, основанной на селективной молекулярной регуляции Eph-эфриновых сигнальных пар. При этом уделяется также внимание функциональной роли Eph-киназ и эфринов в таких механизмах канцерогенеза как клеточная пролиферация и инвазивность.

Ключевые слова: ангиогенез, антиангиогенная терапия, онкология, эфрины, тирозинкиназа Eph.

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ
ФУНКЦИИ Eph-СЕМЕЙСТВА
ТИРОЗИНКИНАЗ

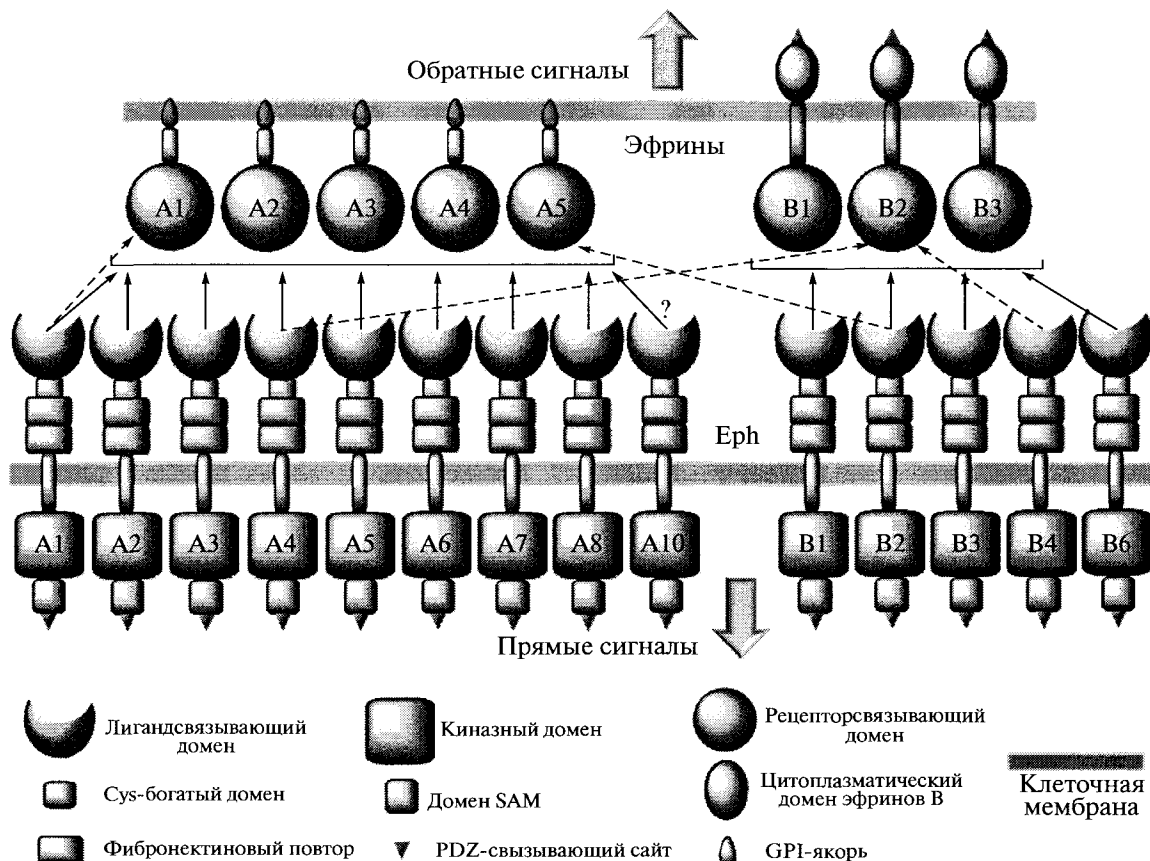
Семейства рецепторных тирозинкиназ Eph и их мембранно-связанных лигандов – эфринов (Ephrins, EFN) имеют широкий профиль экспрессии в эмбриональных и взрослых тканях. Семейство Eph делится на два подкласса – EphA и EphB, в соответствии с их структурной гомологией и предпочтительным взаимодействием либо с эфринами A, связанными с мембранами посредством гликозилфосфатидилинозитольной (GPI) якорной модификации, либо с трансмембранными эфринами B [1, 2]. Eph-семейство является самым большим подклассом рецепторных тирозинкиназ и состоит из 9 рецепторов класса A (EphA1–EphA8, EphA10) и 5 рецепторов класса B (EphB1–EphB4, EphB6) у человека и других млекопитающих; вдобавок у других позвоночных были идентифицированы EphA9 и EphB5 [3, 4]. Эти рецепторы взаимодействуют с 5 эфринами класса A (A1–A5) и 3 эфринами класса B (B1–B3), еще один эфрин A6 не встречается у млекопитающих [3].

Сокращения: ЭК – сосудистые эндотелиальные клетки, EFN – эфрин, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, Fc – константный регион иммуноглобулинов IgG, FGF – фактор роста фибробластов, FGFR – рецептор FGF, PI3-киназа – фосфатидилинозитол-3-киназа, siRNA – малая интерферирующая мРНК, VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста, VEGFR – рецептор VEGF.

* Автор для связи (тел.+1(508) 471-42-71; эл. почта: sergey.zozulya@gmail.com).

Как иллюстрирует рисунок, Eph-рецепторы не обладают строгой лигандной специфичностью внутри комплементарного класса эфринов (EFN), за исключением EphB4, который связывается с высокой аффинностью только с EFN-B2 [5, 6]. Классовая специфичность лиганд-рецепторных взаимодействий также не является абсолютной. Так, EphA4 связывается не только с A-эфринами, но и с эфрином EFN-B2 [1], а киназа EphB2 связывается с EFN-A5 [7]. Следует заметить, что, вследствие широкого диапазона лиганд-рецепторного сродства, наблюдаемого *in vitro*, клеточно-специфической экспрессии этих двух семейств белковых партнеров и их свойству участвовать в нормальных сигнальных процессах в мембранно-ассоциированном состоянии “*in trans*” (за редкими исключениями [8, 9]), в реальном биологическом контексте селективность парных взаимодействий Eph-EFN может быть гораздо выше [1]. Исследования последних лет указывают на то, что межклеточные взаимодействия между мембранно-связанными двумерными кластерами Eph-рецепторов и эфринов регулируют передачу клеточных сигналов на более высоком уровне функциональной сложности, чем канонические взаимодействия между растворимыми лигандами и мембранными рецепторами [10, 11].

Внеклеточный домен Eph-рецепторов гликозилирован и состоит из N-концевого глобулярного домена с иммуноглобулинподобными мотивами, за которым следует цистеинбогатый домен и



Семейства эфринных и их тирозинкиназных рецепторов Eph у млекопитающих: состав, доменная организация и межклеточные взаимодействия. SAM – домен sterile alpha motif, PDZ – домен PDZ (postsynaptic density 95, PSD-85; discs large, Dlg; zonula occludens-1, ZO-1), GPI – гликозилфосфатидилинозитольная C-концевая модификация.

два фибронектиновых повтора типа III; внутриклеточная часть рецепторов содержит регуляторный околомембранный участок, каталитический тирозинкиназный домен, SAM (sterile alpha motif) домен, и C-концевой участок связывания PDZ-доменов внутриклеточных сигнальных белков (рисунок).

Околомембранный участок, киназный и SAM-домены содержат несколько тирозиновых остатков, которые могут фосфорилироваться и служить участками связывания внутриклеточных адаптерных сигнальных белков, содержащих SH2- и РТВ-домены. У EphA10 и EphB6 отсутствует собственная каталитическая активность, но эти рецепторы могут трансфосфорилироваться другими членами семейства в составе гетеродимеров [12].

Структурная организация лигандов-эфринных проще: они содержат рецепторсвязывающие внеклеточные глобулярные домены с несколькими дисульфидными связями, которые связаны с клеточной мембраной посредством C-концевого GPI-якоря (А-эфрины), либо классического трансмембранного домена (В-эфрины). В отличие от эфринных

нов класса А, В-эфрины имеют короткий (десятки аминокислотных остатков) цитоплазматический фрагмент, содержащий C-концевой PDZ-связывающий мотив и консервативные тирозины, способные фосфорилироваться экзогенными киназами.

По сравнению с классическими рецепторными тирозинкиназами, передача сигналов которыми основана на их димеризации в результате связывания с растворимыми полипептидными лигандами, что приводит к трансфосфорилированию внутриклеточных доменов киназ, связыванию ими цитоплазматических адаптерных белков и ферментов и активации внутриклеточных сигнальных каскадов, системы Eph–EFN уникальны вследствие их “двунаправленной” сигнализации [2, 13, 14]. Наряду с традиционной “прямой” сигнализацией, запускаемой посредством эфринзависимой кластеризации Eph-рецепторов в экспрессирующих их клетках, взаимодействия между рецепторами и эфринами инициируют также и “обратную” сигнализацию в эфринэкспрессирующих клетках. В этом случае эфрины выступают как классические мембранные рецепторы, а эктодомены Eph-рецепторов – как их лиганды. Для В-эфринных, “обратная” передача сигналов опосредуется, в частности,

фосфорилированием внутриклеточных тирозинов цитоплазматическими киназами Src-семейства, а эфрины класса А, как считается, используют для своих внутриклеточных сигналов малоизученные корцепторы и киназы Fak и Src-семейства.

Сигнальные механизмы Eph-эфриновых систем и задействованные в них внутриклеточные компоненты, а также взаимодействие этих систем с другими биологически важными сигнальными путями (включая биологию нормы и патологические состояния) относительно неплохо изучены и описаны в многочисленных обзорах [2, 3, 13–16]. За последнее десятилетие, благодаря активным исследованиям с использованием методов рентгеновской кристаллографии [7, 10, 11, 17–20] и ядерного магнитного резонанса [21–24], было также достигнуто существенное понимание на структурно-функциональном уровне лиганд-рецепторных взаимодействий и роли в них отдельных структурных элементов этого семейства. Были изучены взаимодействия Eph-рецепторов с пептидами [25], антителами [26], вирусными рецепторными белками [27] и малыми молекулами [28].

Основная биологическая функция Eph-семейства заключается в регуляции клеточной миграции и адгезии, преимущественно в морфогенезе. Сопряженная активация Eph-рецепторов и их мембранных лигандов-эфринов ведет к координированному отталкиванию, адгезии и инвазии экспрессирующих их клеток. Таким образом, взаимодействие пар этих молекул может определять, куда и как должна двигаться, прикрепляться или открепляться клетка данного типа, что способствует регуляции процессов эмбрионального развития и других биологических механизмов, связанных с локализацией и миграцией клеток. Взаимодействие Eph-рецепторов и эфринов, наряду с другими системами позиционного наведения клеток, может специфически ограничивать движения клеток, приводить клетки в заданные координаты и создавать формы и границы тканей и органов. Двухнаправленная сигнальная трансдукция через Eph-рецепторы и эфрины оказывает влияние на эти процессы не только через регуляцию интегринов, динамики цитоскелета и отталкивания либо адгезии клеток, но также через модуляцию экспрессии генов и перекрестное взаимодействие с другими внутриклеточными сигнальными каскадами [13].

Фундаментальная роль Eph-эфриновой системы в морфогенезе была впервые показана и изучена для случая эмбрионального развития нервной системы и управления ростом и наведением аксонов [29]. Вскоре было показано, что взаимодействие пары EphB4-EFN-B2 является также ключевым фактором, определяющим венозно-артериальную специализацию сосудов в васкулогенезе и нормальное эмбриональное развитие со-

судистой сети [30, 31]. Сегодня крайне важная роль Eph-эфриновой системы в морфогенезе сердечно-сосудистой системы хорошо осознана [32].

Ангиогенез (рост новых кровеносных сосудов из существующих) является частью васкулогенеза (образования кровеносных и лимфатических сосудов *de novo*). В отличие от васкулогенеза, который характерен для эмбрионального развития, ангиогенез является процессом, происходящим в ряде биологических сценариев во взрослом организме не только в физиологически нормальном контексте (заживление ран, пост-ишемическая реконструкция тканей, сосудистое ремоделирование в менструальном цикле), но и в патологии (при росте новообразований, возрастной дегенерации макулы, ретинопатии, ассоциированной с диабетом и преждевременным рождением, ревматоидном артрите, псориазе, атеросклерозе и др.). Главными эфриновыми сигнальными молекулами в ангиогенезе являются артериальный (EphB4) и венозный (EFN-B2) эндотелиальные маркеры, однако участие EphA2 и EFN-A1, а также менее функционально охарактеризованных EphA3-4, EphA7, EphB1-3 и лиганда EFN-B1 в сложном процессе развития нормальной сосудистой системы также известно [3, 33, 34].

Согласно современному научному видению сопряженных процессов нейро- и васкулогенеза, сосуды и нервы пространственно ассоциированы в теле и используют совпадающие или перекрывающиеся механизмы и сигналы для роста, дифференциации и навигации к своим точкам назначения [35, 36]. Наряду с системой Eph-эфрины, известно еще три главных пары семейств рецепторов и лигандов, регулирующих наведение аксонов: нетрины и их рецепторы DCC/Unc, семафорины и их рецепторы плексины и нейропилины, лиганды Slit и их рецепторы Robo. Эти семейства также поначалу исследовались в контексте развития нервной системы, но впоследствии были обнаружены их функции в формировании и зрелости сосудистой системы [35].

Последнее десятилетие приносит растущие доказательства функций семейства Eph-EFN не только в морфогенезе нервной и сосудистой систем в процессе развития организма, но и в регуляции во взрослом организме процессов гомеостаза костной ткани и эпителия кишечника, синаптической пластичности, различных иммунных функций, гематопоеза, метаболизма глюкозы и агрегации тромбоцитов [14–16, 37–39]. Основное внимание в обзоре уделяется только тем функциям и механизмам эфриновых систем в патологии, которые могут служить мишенями для терапии в близком будущем.

В аспекте терапевтического регулирования Eph-эфриновых сигнальных систем, наиболее практически привлекательными являются функ-

ции этих лекарственных мишеней в опухолевом ангиогенезе в сочетании с пролиферацией, выживанием и инвазивностью раковых клеток [3, 40–44]. Кроме того, молекулы, влияющие на функцию этих белков могут найти применение как про- и антиангиогенные средства для лечения других заболеваний, характеризующихся aberrантным ангиогенезом [45–47], а также парамиксовирусных инфекций [27, 48, 49]. Более отдаленные терапевтические применения могут лежать в сфере регенерации нервных тканей [50], нейропатической и воспалительной анальгезии [51], некоторых патологий легких [52] и костных заболеваний [53].

БИОЛОГИЯ Eph-КИНАЗ И ЭФРИНОВ ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ И РАКЕ

1. Опухолевый ангиогенез

За четыре десятилетия, прошедшие со времени выдвижения Д. Фолкманом гипотезы о роли ангиогенеза в опухолевом росте [54], на эту тему были опубликованы десятки тысяч научных публикаций. Антиангиогенная терапия рака концептуально привлекательна по ряду соображений. Прежде всего, общая роль ангиогенеза в развитии опухолей состоит в том, что антиангиогенные агенты могут с универсальностью подавлять широкий круг злокачественных новообразований гетерогенных молекулярно, структурно и по механизмам онкогенеза. В отличие от генетически нестабильных раковых клеток солидных (твердых) опухолей, нормальные эндотелиальные клетки должны иметь меньше селекционных возможностей для выработки лекарственной резистентности при терапии. Немаловажным практическим фактором является и высокая доступность эндотелия, в отличие от клеток солидных опухолей, для таких макромолекул, как полно-размерные антитела, которые могут использоваться либо для прямого ингибирования неоваскуляризации, либо для адресованной доставки конъюгированного противоопухолевого агента к месту локализации опухоли.

Роль кровеносной и лимфатической сосудистых систем в нормальной физиологии нельзя недооценивать, так как эти “рассеянные органы” присутствуют практически в каждой ткани (за исключением хрящевой ткани и роговицы глаза) и характеризуются большой пространственной плотностью сосудистого проникновения. Оценки диффузионно-кинетических пределов кислородного снабжения тканей указывают на то, что гипоксические эффекты наблюдаются уже на удалении 100–200 мкм от ближайшего кровеносного сосуда. Вследствие этих факторов общее число эндотелиальных клеток (ЭК) выстилаю-

щих стенки сосудов человека оценивается в величину $>10^{12}$, то есть по массе около 1 кг [55], без учета гладкомышечных муральных (стеночных) клеток и перицитов.

В контексте терапевтического применения антиангиогенных препаратов, воздействующих на клетки сосудистого эндотелия, это означает необходимость высокой селективности таких лекарств по отношению либо к ЭК, участвующим в активном ангиогенезе, либо к ЭК новообразованных опухолевых сосудов. Такая концепция предполагает наличие специфических молекулярных маркеров-мишеней на активированных ЭК либо ЭК опухолевых сосудов, действительно обнаруженных в многочисленных экспериментальных работах [56–59]. Вдобавок к этому известно, что доля ЭК взрослого человека, находящихся в стадии клеточного деления (то есть, ангиогенно активных), составляет всего лишь около 0.01% от общей популяции преимущественно неактивных сосудистых ЭК [60].

Следует отметить, что, несмотря на клинический успех первого анти-VEGF-препарата – моноклонального антитела Бевацизумаб (Авастин), разработанного компанией Genentech (Roche), это лекарство не очень эффективно в клинике, особенно в режиме монотерапии, а также имеет ряд побочных эффектов, включая серьезные [61]. С достаточной очевидностью это связано с тем фактом, что рецепторы-мишени природных изоформ VEGF (VEGFR1/Flt1, VEGFR2/Flk1/KDR и VEGFR3/Flt4) не являются истинно селективными поверхностными маркерами ангиогенно активных ЭК, либо ЭК опухолевых сосудов (VEGFR3 экспрессируется в основном в лимфатическом эндотелии). Кроме того эффективное ингибирование новообразований, видимо, может требовать не только подавления эндотелиального аспекта ангиогенеза, но и дополнительного воздействия на муральные клетки сосудов и/или опухолевые клетки. Это делает крайне привлекательной идентификацию молекулярных онкомишеней, вовлеченных во множественные механизмы канцерогенеза, для повышения эффективности и безопасности разрабатываемых терапевтических агентов и преодоления резистентности к анти-VEGF-терапии [62]. На сегодняшний день почти все современные мишень-направленные антиангиогенные препараты, уже применяющиеся в клинике, нацелены на сигнальную систему VEGF/VEGFR [63]. Таким образом, поиск лекарственных мишеней/маркеров, специфичных для патологического ангиогенеза, и их экспериментальное подтверждение остаются важнейшей темой в разработке новых, более эффективных терапевтических препаратов в онкологии и других терапевтических областях.

Важная роль нескольких Eph-рецепторов и эфринов, прежде всего детерминантов артериально-венозной специализации EphB4 и EFN-B2, в нормальном ангиогенезе в процессе развития была упомянута ранее. Большой объем данных подтверждает ключевую роль EphB4 и EFN-B2 также и в опухолевом ангиогенезе (как и в других его патологических проявлениях), а кроме того свидетельствует о дополнительных онкогенных функциях этих белков [64–68]. Эти факты с учетом функционирования Eph-рецепторов и эфринов на уровне, отличном от VEGF/VEGFR-системы, делает EphB4 и EFN-B2 привлекательными терапевтическими мишенями при болезнях aberrантного ангиогенеза и онкологии. EphA2 и его основной лиганд EFN-A1 играют ограниченные роли в физиологическом ангиогенезе, однако это пара стимулирует опухолевый ангиогенез, часто гиперэкспрессирована в злокачественных новообразованиях, включая индукцию гипоксией, и проявляет онкогенные свойства [69]. Есть данные о роли в патологическом ангиогенезе рецептора EphA5 [70], но эта мишень нуждается в дополнительном экспериментальном подтверждении.

2. Проллиферативная, опухольсупрессорная активность, клеточная инвазивность

Проллиферативные и антиапоптозные эффекты гиперактивации рецепторных и цитоплазматических тирозинкиназ, вызванные их сверхэкспрессией или образованием слитых онкогенов, уже стали одной из догм молекулярного канцерогенеза и привели к созданию ряда клинических онкологических тирозинкиназных ингибиторов, начиная с Гливека [71]. Eph-подсемейство рецепторных тирозинкиназ позвоночных поначалу не выглядело исключением, так как первый его представитель (EphA1) был открыт путем молекулярного клонирования соответствующей кДНК из гепатокарциномной линии клеток [72], а его сверхэкспрессия в фибробластах 3T3 вызывала их онкогенную трансформацию [73]. Действительно, в ряде случаев показана связь активации Eph-киназ с такими протоонкогенными сигнальными каскадами, как PI3-киназный, Ras-MAP-киназный, Jak/STAT [69]. Как свойственно для протоонкогенов, в отдельных представителях семейства, прежде всего в EphA3, с высокой частотой обнаруживают мутации при геномном анализе образцов различных раковых опухолей [74, 75]. Однако следует отметить что, коррелируя с описанными ранее ключевыми функциями Eph-рецепторов в процессах морфогенеза, их активация в различных клеточно-биологических окружениях обычно ведет не только и не столько к характерной для рецепторных тирозинкиназ пролиферативной и антиапоптозной регуляции ядерных транскрипционных факторов, сколько к регуля-

ции динамики цитоскелета и другим специфическим сигналам, сцепленным с такими белками, как интегрины, кадгеринины, клаудины и GTP-азы семейства Rho [13, 76].

За последние два десятилетия появилось много публикаций с демонстрацией онкогенных эффектов гиперактивации тех или иных представителей Eph-семейства в клеточных и *in vivo*-моделях канцерогенеза и/или положительной корреляции их сверхэкспрессии со злокачественным характером различных новообразований и с неблагоприятным прогнозом для пациентов. Например, в случае EphA2 такие экспериментальные данные имеются для глиобластомы, меланомы, рака толстой кишки, печени, груди, желудка, легких, эндометрии матки, мочевого пузыря, пищевода, яичников, простаты и для других онкологических заболеваний [3, 34, 69].

Для другой хорошо изученной пары EphB4–EFN-B2 положительная связь между гиперэкспрессией/активацией одного или обоих белков и канцерогенезом описана для меланомы, рака толстой кишки, шейки и эндометрия матки, головы и шеи, яичников, пищевода, груди, рабдомиосаркомы, саркомы Капоши [66, 67, 77], хотя соотношение уровней экспрессии EphB4 и EFN-B2 в собственно опухолевых клетках и в сосудистом эндотелии часто неясно.

Только малая часть подобных исследований [78, 79] позволяет делать обоснованные заключения о возможных проопухолевых механизмах действия (митогенный, антиапоптозный, ангиогенный, инвазивный и др.) изучаемых эфринов и их рецепторов и о роли их взаимодействий и двуперпендикулярной трансдукции сигнала в раковых клетках и клетках окружающих тканей, которые могут реализоваться в каждом конкретном случае патологий.

Обширные и разнородные данные об участии различных Eph-рецепторов и эфринов в развитии всевозможных злокачественных новообразований систематизированы в ряде обзоров на эту тему, написанных за последние несколько лет [3, 34, 37, 40, 44, 80–83]. Несмотря на обширные данные, поддерживающие идею о причинно-следственной связи между гиперактивацией Eph-киназ, а зачастую и их лигандов-эфринов, и стимуляцией канцерогенеза, парадокс глобальной картины заключается в том, что большое количество экспериментов указывает на функции того же семейства в качестве опухолевых супрессоров [84–86]. При этом интерпретации часто не могут быть сведены только к природе разных представителей семейства или разных типов рака, так как одни и те же белки ассоциированы с противоположными эффектами, зачастую в сходных моделях и типах опухолей. Для того чтобы рационально осмыслить такие наблюдения, требуется понимание

всех механизмов участия эфриновых систем в канцерогенезе.

Одна из ролей эфриновых сигнальных систем в онкологии, понимание которой стало оформляться недавно, состоит в их участии в регуляции клеточной инвазивности и метастазирования [42, 43]. Гипотезы о том, что лиганд-рецепторное семейство, управляющее в норме взаимодействием и миграцией клеток, может играть роль также и в распространении раковых клеток при его функциональной дерегуляции в канцерогенезе вполне естественны, но детальные исследования подобных механизмов появились только в последние несколько лет [3]. Эти работы демонстрируют, что повышение инвазивности и диссеминации различных типов рака может быть вызвано в разных случаях либо активацией либо подавлением [87, 88] Eph-рецепторов или эфринов А- и В-классов и может в некоторых случаях вообще не опосредоваться каталитической активностью Eph-киназ [78]. Ключевыми факторами тут являются не абсолютная сигнальная активность отдельного представителя семейства, а патологический дисбаланс в их адгезионно-репульсионных взаимодействиях, а также суммарная составляющая многих наложенных друг на друга функций участвующих Eph-рецепторов, эфринов и сцепленных с ними сигнальных путей в окружении конкретного новообразования [82, 83, 89].

Помимо уже упомянутой роли Eph-эфринов в канцерогенезе, связанной с прямой митогенной, антиапоптозной и проангиогенной сигнализацией, наряду с проинвазивным aberrантным морфогенезом и клеточной адресацией, важны и аспекты, связанные с переплетением (cross-talk) с другими сигнальными путями. Так, в случаях агрессивного рака груди показаны крайне важное кооперативное взаимодействие EphA2 с классическим протоонкогеном ErbB2/Neu/HER2 и простирающаяся от этого EphA2-зависимая устойчивость таких опухолей к препарату трастузумаб/Herceptin [90]. При немелкоклеточном раке легкого повышенная экспрессия EGFR положительно связана с экспрессией и активацией EphA2, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом [91]. В противоположность этим фактам, гиперактивация EphA5 при глиоме отрицательно регулирует активность EGFR, и, следовательно, EphA5 играет тут роль опухолевого супрессора [92]. Подобное прямое функциональное взаимодействие между гетерологичными рецепторными киназами показано и для случая EphA4 и рецепторов семейства FGFR. Повышенная экспрессия EphA4 промотирует митогенные сигналы FGF и рост глиобластомы [93, 94]. Недавно была установлена важная регуляторная роль EFN-B2 в контроле интернализации рецепторов VEGFR2 и VEGFR3 [95, 96]. Таким образом установлено дополнительное взаимодействие между сигналами VEGF и эф-

риновой системой, которые считались сильно разобщенными в ангиогенезе и лимфоангиогенезе.

Только понимание всех подобных связей и механизмов в онкогенном контексте специфических типов рака может объяснить “парадоксы” ингибирования Eph-эфринов в онкологических моделях и облегчить выбор дороги в клинику для направленных модуляторов этих мишеней.

Примером детализованных и элегантных исследований причин функциональной двойственности Eph-эфринов в канцерогенезе являются работы группы Паскуале [14, 85], посвященные множественным механизмам действия EphB4 и EFN-B2 при раке груди. В ряде недавних статей были также детально исследованы разнонаправленные механизмы действия других Eph-эфринов при различных видах рака [83, 86, 89, 97]. Лейтмотив подобных работ заключается в том, что эффект фармакологического агента на мишень этого класса будет опосредоваться множественными взаимодействиями Eph-EFN и их межклеточными распределениями в участке патологии и за его пределами, а также участием сопряженных сигнальных путей и изменениями этой среды в ходе развития опухоли.

В качестве иллюстрации, рецептор EphB4 и его мембранно-связанный лиганд EFN-B2 могут экспрессироваться (“in trans” или “in cis”, и в разных пропорциях, которые могут меняться с развитием опухоли) на раковых клетках данного типа с их специфическими сигнальными путями, в эндотелиальных клетках опухолевых сосудов, муральных клетках сосудов и клетках окружающей здоровой ткани. EFN-B2 может вдобавок взаимодействовать с другими рецепторами В-типа, присутствующими на этих же клетках. Суммарная составляющая прямых и обратных сигналов Eph-EFN-пар в этом локально взаимодействующем репертуаре клеток будет определять поведение опухоли со стороны ангиогенеза, пролиферации и инвазии, а, следовательно, возможность и конкретные способы терапевтического воздействия.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ФУНКЦИЙ Eph-КИНАЗ И ЭФРИНОВ

1. Малые молекулы и пептиды

Ингибирование энзиматической активности гиперактивных тирозинкиназ является уже классическим фармакологическим подходом в онкологии, подтвержденным клиническим использованием около 10 малых молекул и текущими клиническими испытаниями ряда других низкомолекулярных ингибиторов таких онкогенов, как EGFR, VEGFR, PDGFR, Ret, Met, Flt3, Abl, Src и др. [71, 98]. В связи со специфическими особенностями функции Eph-семейства в канцерогенезе, обусловленными двунаправленной пе-

редачей сигналов с участием клеток опухоли, сосудистого эндотелия и прилегающей стромы, а также неоднозначной связью между пролиферативностью и инвазивностью клеток и уровнем Eph-киназной активности, экстраполяция этого подхода на данное семейство не очевидна и требует тщательного предклинического подтверждения в адекватных моделях *in vivo*. Подобное подтверждение осложняется существованием 14 гомологичных Eph-рецепторов и отсутствием до последнего времени селективных низкомолекулярных ингибиторов отдельных Eph-киназ, которые могли бы служить адекватными фармакологическими инструментами для таких исследований. Следует отметить, что киназная селективность многих киназных ингибиторов, внедренных в клинику или проходящих предклинические испытания, невысока, как вследствие принципиальной проблематичности создания высокоселективных АТФ-конкурентных ингибиторов [99], так и благодаря созданию киназных ингибиторов широкого спектра действия в соответствии с ныне популярной в онкотерапии концепции об эффективности одновременного ингибирования нескольких киназ-мишеней [100].

Так, профилирование спектров ингибиторной активности продвинутых предклинических ингибиторов на больших панелях киназ человека позволило выявить ряд многомишеневых ингибиторов, проявляющих активность и на некоторых представителях Eph-семейства [101–104]. Однако недостаточная специфичность вышеупомянутых соединений не позволяет использовать их для достоверной проверки эффективности Eph-направленных терапий. Только недавно появились сообщения о существенном прогрессе в создании селективных низкомолекулярных ингибиторов каталитической активности Eph-киназ [28, 105]. Один из этих ингибиторов с высокой эффективностью подавляет VEGF-зависимый ангиогенез в модели *in vivo* [106]. Помимо разработки ингибиторов каталитической активности, было сообщено также о создании низкомолекулярных химических соединений, связывающихся с внеклеточными доменами EphA2 и EphA4 и ингибирующих в микромолярных концентрациях их взаимодействие с лигандом EFN-A5 [21, 107].

Разработка мощных и селективных пептидов-блокаторов лиганд-рецепторных взаимодействий является несколько менее сложной задачей, чем поиск подобных малых молекул непептидной природы, и может осуществляться и рационально, на основе известных лиганд-рецепторных структур, и с применением таких методов пептидной селекции, как фаговый дисплей. В то время как такие пептиды являются хорошими инструментами для подтверждения терапевтических стратегий, их превращение в успешные лекарственные препараты часто затруднено в силу пло-

хой биодоступности и стабильности. Первые пептидные лиганды EphA2 с субмикромолярными константами диссоциации, включая эфринподобный агонист, были найдены с помощью фагового дисплея [108] и впоследствии оптимизированы [109]. Были также описаны специфические пептидные лиганды к рецепторам EphA5 и EphA7 [110], EphB1, EphB2, and EphB4 [25, 111, 112], включая пептиды, сравнимые по аффинности с природными лигандами [6, 112]. Пептидные антагонисты EphA4 исследовались в целях модуляции нейронной функции и регенерации [50, 110], а пептидный лиганд EphA2 – для таргетной доставки рекомбинантного аденовируса в клетки панкреатического рака [113]. Пептидный лиганд EphB4 также применялся как фармакологический инструмент в исследовании остеогенеза [114].

2. Антитела, белки и другие макромолекулы

В работах, опубликованных рядом групп, была изучена возможность модуляции неоваскуляризации в различных животных моделях рекомбинантными растворимыми эктодоменами EphB4 и EFN-B2. Так, растворимый мономерный эктодомен EphB4 (sEphB4) ингибировал неоваскуляризацию в различных моделях и подавлял рост раковых клеток в подкожных ксенографтах [115–117]. Другая форма sEphB4 имела выраженную активность, аддитивную с действием антитела против VEGF, в клеточных тестах и мышинных ксенографтных моделях высоко васкуляризованного рака – саркомы Капоши [77]. В мышинной внутриглазной модели гипоксической ангиопротективной ретинопатии мономерная форма EFN-B2 ингибировала ангиогенез, в то время как димеризованные формы EphB4-Fc и EFN-B2-Fc его усиливали [118]. Эти и некоторые другие данные [119] соответствуют простой модели, в которой усиление прямой либо обратной сигнализации через пару EphB4-EFN-B2 активирует ангиогенез, а ингибирование лиганд-рецепторного взаимодействия – блокирует.

В другой работе антиангиогенный эффект в модели гипоксической ретинопатии был продемонстрирован для EphB4-Fc и EFN-B2-Fc [120]. Не исключено, что EFN-B2-Fc может также стимулировать апоптоз ЭК в условиях патологической неоваскуляризации [121]. EFN-B2-Fc имеет противоопухолевое действие в ксенографтной модели рака головы и шеи, однако ангиогенная составляющая этого эффекта не вполне ясна [122]. Еще в одной публикации противораковый эффект EphB4-Fc, но не EFN-B2-Fc, при множественной миеломе был объяснен комбинациями регуляторных эффектов этой пары белков на ангио-, остеокласто- и остеобластогенез в отсутствие прямого воздействия на сами клетки миеломы [123]. Вне зависимости от краткосрочных

эффектов очевидно, что отдельно взятые Fc-димеризованные EphB4 и EFN-B2 вряд ли могут поддержать продолжительное сбалансированное развитие нормальной сосудистой сети [124]. Помимо пары EphB4 и EFN-B2, были показаны воздействие ряда других эктодоменов эфринов и рецепторов В-класса на канцерогенез и ангиогенез, включая EphB1-Fc [125], EphB2-Fc [126], EFN-B1-Fc [127]. Интересно отметить сообщение об ускорении заживления ран кишечного эпителия введением EphB1-Fc, опосредованное независимым от ангиогенеза механизмом [128].

Ингибирование опухолевого ангиогенеза и пролиферации раковых клеток химерными белками EphA2-Fc и EphA3-Fc, либо EFN-A1-Fc, было продемонстрировано на моделях рака поджелудочной и молочной желез [129, 130], а их антиангиогенное действие было также показано на моделях, не имеющих отношения к онкологии [131]. Цитотоксический конъюгат EFN-A1 с экзотоксином *A. P. aeruginosa* показал селективность и эффективность на клетках глиобластомы [132]. Описана также целенаправленная доставка покрытых EFN-A1 наночастиц из металлизированного силикагеля к EphA2-экспрессирующим клеткам рака простаты PC3 и селективная термоабляция этих клеток инфракрасным лазером [133].

Рекомбинантные терапевтические антитела представляют сейчас одно из самых быстро развивающихся биофармацевтических направлений. Очевидно, что этот класс препаратов крайне привлекателен также и для регулирования эфриновых сигнальных систем. Подобно рекомбинантным эктодоменам, антитела могут нейтрализовать лиганд-рецепторные взаимодействия (не только прямым лигандконкурентным способом), временно активировать Eph-рецепторы либо эфрины и вызвать их интернализацию и деградацию. Антитела могут также служить средством адресованной доставки цитотоксина или агента визуализации опухоли, либо иметь эффекторные константные домены, опосредующие цитолиз опухоли иммунными клетками или системой комплемента.

Антитела были эффективно использованы в моделях нескольких типов рака и ряда Eph-эфриновых мишеней. Моноклональные антитела против киназы EphA2, гиперэкспрессированной в клетках рака груди, подавляли их злокачественный рост [134, 135]. Эффект антител против EphA2 был также продемонстрирован в модели рака поджелудочной железы [136]. Показана и эффективность в животных моделях агонистических, вызывающих эндотелиоз EphA2 антител в виде конъюгата с цитотоксином [137], а также биспецифического антитела анти-EphA2-CD3 [138]. Антитело против EphA3 а также соответствующее лигандное производное EFN-A5-Fc

имеют потенциал селективных противоопухолевых агентов для EphA3-зависимых раков [139]. В случае рецепторов В-класса, показано ингибирование глиомы U87 нейтрализующими антителами против EphB2 либо EFN-B2 [140] и эффект антитела против EphB2 в виде конъюгата с цитотоксином в раке кишечника [141]. В серии статей была детально изучена сравнительная эффективность моноклональных антител против EphB4 с разным механизмом действия в моно- и комбинационных терапиях рака [117, 142, 143]. Нейтрализующие антитела против парамиксовирусных капсидных гликопротеинов, рекомбинантные капсидные белки и эфрины были также использованы в последние несколько лет как инструменты исследования блокады взаимодействий вирус-эфрин с целью разработки противовирусных препаратов [27], что объясняется недавней идентификацией эфринов B2 и B3 в качестве селективных эндотелиальных и нейрональных клеточных рецепторов высокопатогенных вирусов человека и животных Нипа (NiV) и Хендра (NiH) [48, 144].

Помимо работ о пассивной иммуноглобулиновой терапии, было опубликовано несколько подходов к созданию противораковых вакцин, в том числе вакцин дендритного типа, с использованием EphA2 и онкоспецифической изоформы EphB6 [145–147]. Интересно использование адьювантных амфифильных наночастиц с иммобилизованным EphA2 для высокоэффективного получения вакцины против рака кишечника и печени [148].

Подавление функции таких рецепторов, как EphA1 [149], EphA2 [150], EphA4 [151], EphB3 [126], EphB4 [143], EFN-B2 [152], и изучение их действия на ангиогенез и канцерогенез было осуществлено во многих работах не только с использованием белковых молекул, но и с помощью siRNA. Успех терапевтического применения этой технологии в будущем зависит от решения кардинальных технических вопросов тканевой доставки и стабильности siRNA *in vivo*.

По сравнению с исследованиями по созданию антиангиогенных агентов, возможность использования эфринов и их рецепторов в терапевтическом усилении ангиогенеза изучена гораздо меньше. Существует много данных по проангиогенным эффектам рекомбинантных версий EFN-B2 в модельных клеточных системах. Специфика межклеточного механизма взаимодействия эфрин-рецептор предполагает, что иммобилизация эфринов на макроносителях может быть эффективным подходом в ангиогенной тканевой инженерии. Мун и др. [46] опубликовали положительные данные испытаний синтетического гидрогеля с иммобилизованным EFN-A1 в клеточных тестах на стимулирование формирования эндотелиальной трубки. Ранее сходные данные были опубликованы для EFN-B2, экспо-

нированного на фибриновой матрице [47]. В последние годы несколькими группами исследователей были получены также интересные результаты на животных моделях. Интраперитонеальные инъекции химерного белка EFN-B2-Fc стимулировали митоз ЭК и повышали плотность капилляров в ишемических мышцах до нормальных уровней в хирургической модели инфаркта миокарда в мышцах [153]. В мышинной модели ишемии задних конечностей введение сходного химерного белка EFN-B2 с константным иммуноглобулиновым доменом вызывало выраженную EphB4-зависимую стимуляцию ангиогенного потенциала предшественников ЭК, включая их локализацию в ишемических сайтах, адгезивность и экспрессию адгезионных маркеров, что подтверждает возможность использования агонистов EphB4 как адьювантов при трансплантационной клеточной проангиогенной терапии [45]. Проангиогенные эффекты *ex* и *in vivo* показаны также для EFN-B1-Fc [127].

Как уже упоминалось выше, различные формы рекомбинантных растворимых эфринов могут оказывать как анти- так и проангиогенное действие в различных клеточных и животных моделях. Это находится в противоречии с упрощенной схемой ассоциации блокирования сигнала с мономерностью, либо сигнальной активации с мультимерностью соответствующих рекомбинантных белковых конструкций. Тщательный сравнительный анализ подобных данных с учетом деталей молекулярного дизайна химерных рекомбинантных белков, конкретных тест-систем и протоколов необходим для критической оценки возможности применения этих экспериментальных наблюдений в клинике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на интенсивные исследования роли Eph-эфриновых сигнальных систем в онкологии и aberrантном ангиогенезе в последние десять лет, сегодня почти нет соответствующих селективных фармакологических агентов, входящих в фазу клинических испытаний для этих патологий [3, 154]. Одним из главных препятствий к этому является, очевидно, сложность множественных взаимодействий внутри этого обширного семейства рецепторов и лигандов в совокупности с его многосторонними биологическими функциями, включающими не только морфогенез в процессе развития, но и регуляцию ряда биологических процессов гомеостаза взрослого состояния [14]. При испытании эфриновых модуляторов в животных моделях патологических состояний часто наблюдаются парадоксальные, противоречивые эффекты, связанные со сложными взаимодействиями Eph-рецепторов и их лигандов одновременно на нескольких типах клеток [82, 155].

К признанным и перспективным мишеням в этой группе следует на сегодняшний день отнести рецепторы EphA2 и EphB4 и их лиганды — EFN-A1, EFN-A5 и EFN-B2 соответственно. Для пары EphB4—EFN-B2 предпочтительным целевым механизмом в молекулярной терапии является ее глубоко экспериментально обоснованная фундаментальная роль в ангиогенезе, которая функционально отделена от роли VEGF-системы. Для EphA2, вдобавок к ангиогенным эффектам, ключевой является хорошо изученная онкогенная функция и гиперэкспрессия этого рецептора во многих типах рака. Это дает надежду увидеть несколько лекарственных кандидатов, направленных на эти мишени, в клинических испытаниях в ближайшие годы. Дальнейший прогресс в этой области будет основан на более глубоком фундаментальном понимании биологии Eph-эфриновых систем и разработке модификаторов их функций с высокой степенью как молекулярной, так и органо-тканевой адресации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была поддержана грантами № 02.740.11.5224 и № 14.740.11.0170 Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gale N.W., Holland S.J., Valenzuela D.M., Flenniken A., Pan L., Ryan T.E., Henkemeyer M., Strebhardt K., Hirai H., Wilkinson D.G. et al. // *Neuron*. 1996. V. 17. P. 9–19.
2. Kullander K., Klein R. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 3. P. 475–486.
3. Pasquale E.B. // *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. P. 165–180.
4. Aasheim H.C., Patzke S., Hjorthaug H.S., Finne E.F. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1723. P. 1–7.
5. Blits-Huizinga C.T., Nelersa C.M., Malhotra A., Liebl D.J. // *IUBMB Life*. 2004. V. 56. P. 257–265.
6. Chrencik J.E., Brooun A., Kraus M.L., Recht M.I., Kolatkar A.R., Han G.W., Seifert J.M., Widmer H., Auer M., Kuhn P. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 28185–28192.
7. Himanen J.P., Chumley M.J., Lackmann M., Li, C., Barton W.A., Jeffrey P.D., Vearing C., Geleick D., Feldheim D.A., Boyd A.W. et al. // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. P. 501–509.
8. Alford S.C., Bazowski J., Lorimer H., Elowe S., Howard P.L. // *Exp. Cell. Res.* 2007. V. 313. P. 4170–4179.
9. Egea J., Klein R. // *Trends Cell. Biol.* 2007. V. 17. P. 230–238.
10. Himanen J.P., Yermekbayeva L., Janes P.W., Walker J.R., Xu K., Atapattu L., Rajashankar K.R., Mensinga A., Lack-

- mann M., Nikolov D.B., Dhe-Paganon S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 10860–10865.
11. Seiradake E., Harlos K., Sutton G., Aricescu A.R., Jones E.Y. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2010. V. 17. P. 398–402.
 12. Freywald A., Sharfe N., Roifman C.M. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 3823–3828.
 13. Arvanitis D., Davy A. // Genes Dev. 2008. V. 22. P. 416–429.
 14. Pasquale E.B. // Cell. 2008. V. 133. P. 38–52.
 15. Miao H., Wang B. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2009. V. 41. P. 762–770.
 16. Klein R. // Nat. Neurosci. 2009. V. 12. P. 15–20.
 17. Himanen J.P., Henkemeyer M., Nikolov D.B. // Nature. 1998. V. 396. P. 486–491.
 18. Thanos C.D., Goodwill K.E., Bowie J.U. // Science. 1999. V. 283. P. 833–836.
 19. Stapleton D., Balan I., Pawson T., Sicheri F. // Nat. Struct. Biol. 1999. V. 6. P. 44–49.
 20. Himanen J.P., Rajashankar K.R., Lackmann M., Cowan C.A., Henkemeyer M., Nikolov D.B. // Nature. 2001. V. 414. P. 933–938.
 21. Qin H., Shi J., Noberini R., Pasquale E.B., Song J. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29473–29484.
 22. Qin H., Noberini R., Huan X., Shi J., Pasquale E.B., Song J. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 644–665.
 23. Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Mineev K.S., Tkach E.N., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biophys. J. 2010. V. 98. P. 881–889.
 24. Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Artemenko E.O., Efremov R.G., Arseniev A.S. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29385–29395.
 25. Chrencik J.E., Brooun A., Recht M.I., Nicola G., Davis L.K., Abagyan R., Widmer H., Pasquale E.B., Kuhn P. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 36505–36513.
 26. Oganessian V., Damschroder M.M., Phipps S., Wilson S.D., Cook K.E., Wu H., Dall'Acqua W.F. // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 2010. V. 66. P. 730–733.
 27. Bowden T.A., Aricescu A.R., Gilbert R.J., Grimes J.M., Jones E.Y., Stuart D.I. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2008. V. 15. P. 567–572.
 28. Choi Y., Syeda F., Walker J.R., Finerty P.J., Jr., Cuerrier D., Wojciechowski A., Liu Q., Dhe-Paganon S., Gray N.S. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. V. 19. P. 4467–4470.
 29. Flanagan J.G., Vanderhaeghen P. // Annu. Rev. Neurosci. 1998. V. 21. P. 309–345.
 30. Wang H.U., Chen Z.F., Anderson D.J. // Cell. 1998. V. 93. P. 741–753.
 31. Gerety S.S., Wang H.U., Chen Z.F., Anderson D.J. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 403–414.
 32. Kuijper S., Turner C.J., Adams R.H. // Trends Cardiovasc. Med. 2007. V. 17. P. 145–151.
 33. Brantley-Sieders D.M., Chen J. // Angiogenesis. 2004. V. 7. P. 17–28.
 34. Mosch B., Reissenweber B., Neuber C., Pietzsch J. // J. Oncol. 2010. V. 2010. P. 135–285.
 35. Carmeliet P., Tessier-Lavigne M. // Nature. 2005. V. 436. P. 193–200.
 36. Melani M., Weinstein B.M. // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2010. V. 26. P. 639–665.
 37. Merlos-Suarez A., Batlle E. // Curr. Opin. Cell Biol. 2008. V. 20. P. 194–200.
 38. Matsuo K. // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 658. P. 95–103.
 39. Pasquale E.B. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. P. 462–475.
 40. McCarron J.K., Stringer B.W., Day B.W., Boyd A.W. // Future Oncol. 2010. V. 6. P. 165–176.
 41. Janes P.W., Adikari S., Lackmann M. // Curr. Cancer Drug Targets. 2008. V. 8. P. 473–479.
 42. Campbell T.N., Robbins S.M. // Curr. Issues Mol. Biol. 2008. V. 10. P. 61–66.
 43. Wimmer-Kleikamp S.H., Lackmann M. // IUBMB Life. 2005. V. 57. P. 421–431.
 44. Surawska H., Ma P.C., Salgia R. // Cytokine Growth Factor Rev. 2004. V. 15. P. 419–433.
 45. Foubert P., Silvestre J.S., Souttou B., Barateau V., Martin C., Ebrahimian T.G., Lere-Dean C., Contreres J.O., Sulpice E., Levy B.I. et al. // J. Clin. Invest. 2007. V. 117. P. 1527–1537.
 46. Moon J.J., Lee S.H., West J.L. // Biomacromolecules. 2007. V. 8. P. 42–49.
 47. Zisch A.H., Zeisberger S.M., Ehrbar M., Djonov V., Weber C.C., Ziemiecki A., Pasquale E.B., Hubbell J.A. // Biomaterials. 2004. V. 25. P. 3245–3257.
 48. Negrete O.A., Levroney E.L., Aguilar H.C., Bertolotti-Ciarlet A., Nazarian R., Tajyar S., Lee B. // Nature. 2005. V. 436. P. 401–405.
 49. Xu K., Rajashankar K.R., Chan Y.P., Himanen J.P., Broder C.C., Nikolov D.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 9953–9958.
 50. Fabes J., Anderson P., Brennan C., Bolsover S. // Eur. J. Neurosci. 2007. V. 26. P. 2496–2505.
 51. Zhao J., Yuan G., Cendan C.M., Nassar M.A., Lagerstrom M.C., Kullander K., Gavazzi I., Wood J.N. // Mol. Pain. 2010. V. 6. P. 77.
 52. Cercone M.A., Schroeder W., Schomberg S., Carpenter T.C. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2009. V. 297. P. L856–L863.
 53. Edwards C.M., Mundy G.R. // Int. J. Med. Sci. 2008. V. 5. P. 263–272.
 54. Folkman J. // N. Engl. J. Med. 1971. V. 285. P. 1182–1186.
 55. Jaffe E.A. // Hum. Pathol. 1987. V. 18. P. 234–239.
 56. Seaman S., Stevens J., Yang M.Y., Logsdon D., Graff-Cherry C., St.Croix B. // Cancer Cell. 2007. V. 11. P. 539–554.
 57. Roesli C., Neri D. // J. Proteomics. 2010. V. 73. P. 2219–2229.
 58. Durr E., Yu J., Krasinska K.M., Carver L.A., Yates J.R., Testa J.E., Oh P., Schnitzer J.E. // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 985–992.

59. Oh P., Li Y., Yu J., Durr E., Krasinska K.M., Carver L.A., Testa J.E., Schnitzer J.E. // *Nature*. 2004. V. 429. P. 629–635.
60. Hanahan D., Folkman J. // *Cell*. 1996. V. 86. P. 353–364.
61. Ferrara N., Hillan K.J., Gerber H.P., Novotny W. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2004. V. 3. P. 391–400.
62. Azam F., Mehta S., Harris A.L. // *Eur. J. Cancer*. 2010. V. 46. P. 1323–1332.
63. Kessler T., Bayer M., Schwoppe C., Liersch R., Mesters R.M., Berdel W.E. // *Recent Results Cancer Res.* 2010. V. 180 P. 137–163.
64. Kumar S.R., Singh J., Xia G., Krasnoperov V., Hassanieh L., Ley E.J., Sehnet J., Kumar N.G., Hawes D., Press M.F., Weaver F.A., Gill P.S. // *Am. J. Pathol.* 2006. V. 169. P. 279–293.
65. Masood R., Kumar S.R., Sinha U.K., Crowe D.L., Krasnoperov V., Reddy, R.K., Zozulya S., Singh J., Xia G., Broek D., Schonthal A.H., Gill P.S. // *Int. J. Cancer*. 2006. V. 119. P. 1236–1248.
66. Xia G., Kumar S.R., Stein J.P., Singh J., Krasnoperov V., Zhu S., Hassanieh L., Smith D.L., Buscarini M., Broek D., Quinn D.A., Weaver F.A., Gill P.S. // *Oncogene*. 2006. V. 25. P. 769–780.
67. Alam S.M., Fujimoto J., Jahan I., Sato E., Tamaya T. // *Br. J. Cancer*. 2008. V. 98. P. 845–851.
68. Alam S.M., Fujimoto J., Jahan I., Sato E., Tamaya T. // *Gynecol. Oncol.* 2009. V. 114. P. 84–88.
69. Wykosky J., Debinski W. // *Mol. Cancer Res.* 2008. V. 6. P. 1795–1806.
70. Almog N., Ma L., Raychowdhury R., Schwager C., Erber R., Short S., Hlatky L., Vajkoczy P., Huber P.E., Folkman J., Abdollahi A. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. P. 836–844.
71. Pytel D., Sliwinski T., Poplawski T., Ferriola D., Majsterek I. // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2009. V. 9. P. 66–76.
72. Hirai H., Maru Y., Hagiwara K., Nishida J., Takaku F. // *Science*. 1987. V. 238. P. 1717–1720.
73. Maru Y., Hirai H., Takaku F. // *Oncogene*. 1990. V. 5. P. 445–447.
74. Ding L., Getz G., Wheeler D.A., Mardis E.R., McLellan M.D., Cibulskis K., Sougnez C., Greulich H., Muzny D.M., Morgan M.B. et al. // *Nature*. 2008. V. 455. P. 1069–1075.
75. Lee D.J., Schonleben F., Banuchi V.E., Qiu W., Close L.G., Assaad A.M., Su G.H. // *Cancer Biol. Ther.* 2010. V. 10. P. 689–693.
76. Bashaw G.J., Klein R. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. P. a001941.
77. Sehnet J. S., Ley E.J., Krasnoperov V., Liu R., Manchanda P.K., Sjoberg E., KostECKE A.P., Gupta S., Kumar S.R., Gill P.S. // *Blood*. 2009. V. 113. P. 254–263.
78. Taddei M.L., Parri M., Angelucci A., Onnis B., Bianchini F., Giannoni E., Raugeri G., Calorini L., Rucci N., Teti A., Bologna M., Chiarugi P. // *Am. J. Pathol.* 2009. V. 174. P. 1492–1503.
79. Feng Y.X., Zhao J.S., Li J.J., Wang T., Cheng S.Q., Yuan Y., Wang F., Wang X.F., Xie D. // *Hepatology*. 2010. V. 51. P. 535–544.
80. Nakamoto M., Bergemann A.D. // *Microsc. Res. Tech.* 2002. V. 59. P. 58–67.
81. Castano J., Davalos V., Schwartz S., Jr., Arango D. // *Histol. Histopathol.* 2008. V. 23. P. 1011–1023.
82. Vaught D., Brantley-Sieders D.M., Chen J. // *Breast Cancer Res.* 2008. V. 10. P. 217.
83. Herath N.I., Boyd A.W. // *Int. J. Cancer*. 2010. V. 126. P. 2003–2011.
84. Batlle E., Bacani J., Begthel H., Jonkheer S., Gregorieff A., van de Born M., Malats N., Sancho E., Boon E., Pawson T., Gallinger S., Pals S., Clevers H. // *Nature*. 2005. V. 435. P. 1126–1130.
85. Noberini R., Pasquale E.B. // *Cancer Cell*. 2009. V. 16. P. 452–454.
86. Truitt L., Freywald T., DeCoteau J., Sharfe N., Freywald A. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. P. 1141–1153.
87. Dong Y., Wang J., Sheng Z., Li G., Ma H., Wang X., Zhang R., Lu G., Hu Q., Sugimura H., Zhou X. // *Mod. Pathol.* 2009. V. 22. P. 151–160.
88. Tanaka M., Kamata R., Yanagihara K., Sakai R. // *Cancer Sci*. 2010. V. 101. P. 87–93.
89. Astin J.W., Batson J., Kadir S., Charlet J., Persad R.A., Gillatt D., Oxley J.D., Nobes C.D. // *Nat. Cell. Biol.* 2010. Epub 11/16/2010.
90. Zhuang G., Brantley-Sieders D.M., Vaught D., Yu J., Xie L., Wells S., Jackson D., Muraoka-Cook R., Arteaga C., Chen J. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. P. 299–308.
91. Larsen A.B., Stockhausen M.T., Poulsen H.S. // *Cell Signal*. 2010. V. 22. P. 636–644.
92. Li J.J., Liu D.P., Liu G.T., Xie D. // *Oncogene*. 2009. V. 28. P. 1759–1768.
93. Yokote H., Fujita K., Jing X., Sawada T., Liang S., Yao L., Yan X., Zhang Y., Schlessinger J., Sakaguchi K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, V. 102. P. 18866–18871.
94. Fukai J., Yokote H., Yamanaka R., Arao T., Nishio K., Itakura T. // *Mol. Cancer Ther.* 2008. V. 7. P. 2768–2778.
95. Sawamiphak S., Seidel S., Essmann C.L., Wilkinson G.A., Pitulescu M.E., Acker T., Acker-Palmer A. // *Nature*. 2010. V. 465. P. 487–491.
96. Wang Y., Nakayama M., Pitulescu M.E., Schmidt T.S., Bochenek M.L., Sakakibara A., Adams S., Davy A., Deutsch U., Luthi U., Barberis A., Benjamin L.E., Makinen T., Nobes C.D., Adams R.H. // *Nature*. 2010. V. 465. P. 483–486.
97. Miao H., Li D.Q., Mukherjee A., Guo H., Petty A., Cutter J., Basilion J. P., Sedor J., Wu J., Danielpour D., Sloan A.E., Cohen M.L., Wang B. // *Cancer Cell*. 2009. V. 16. P. 9–20.
98. Johnson L.N. // *Q. Rev. Biophys.* 2009. V. 42. P. 1–40.
99. Fabian M.A., Biggs W.H., 3rd, Treiber D.K., Atteridge C.E., Azimioara M.D., Benedetti M.G., Carter T.A., Ciceri P., Edeen P.T., Floyd M., Ford J.M., Galvin M., Gerlach J.L., Grotzfeld R.M., Herrgard S., Insko D.E., Insko M.A., Lai A.G., Lélías J.M., Mehta S.A., Milanov Z.V., Velasco A.M., Wodicka L.M., Patel H.K., Zarrinkar P.P., Lockhart D.J. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 329–336.
100. Faivre S., Demetri G., Sargent W., Raymond E. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007. V. 6. P. 734–745.

101. Rix U., Remsing Rix L.L., Terker, A.S., Fernbach N.V., Hantschel O., Planyavsky M., Breitwieser F.P., Herrmann H., Colinge J., Bennett K.L., Augustin M., Till J.H., Heinrich M.C., Valent P., Superti-Furga G. // *Leukemia*. 2010. V. 24. P. 44–50.
102. Chang Q., Jorgensen C., Pawson T., Hedley D.W. // *Br. J. Cancer*. 2008. V. 99. P. 1074–1082.
103. Caligiuri M., Molz L., Liu Q., Kaplan F., Xu J.P., Majeti J.Z., Ramos-Kelsey R., Murthi K., Lievens S., Tavernier J., Kley N. // *Chem. Biol.* 2006. V. 13. P. 711–722.
104. Lafleur K., Huang D., Zhou T., Caflisch A., Nevado C. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. P. 6433–6446.
105. Bardelle C., Barlaam B., Brooks N., Coleman T., Cross D., Ducray R., Green I., Brempt C.L., Olivier A., Read J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. P. 6242–6245.
106. Martiny-Baron G., Holzer P., Billy E., Schnell C., Bruggen J., Ferretti M., Schmiedeberg N., Wood J.M., Furet P., Imbach P. // *Angiogenesis*. 2010. V. 13. P. 259–267.
107. Noberini R., Koolpe M., Peddibhotla S., Dahl R., Su Y., Cosford N.D., Roth G.P., Pasquale E.B. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 29461–29472.
108. Koolpe M., Dail M., Pasquale E.B. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 46974–46979.
109. Mitra S., Duggineni S., Koolpe M., Zhu X., Huang Z., Pasquale E.B. // *Biochemistry*. 2010. V. 49. P. 6687–6695.
110. Murai K.K., Nguyen L.N., Koolpe M., McLennan R., Krull C.E., Pasquale E.B. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2003. V. 24. P. 1000–1011.
111. Koolpe M., Burgess R., Dail M., Pasquale E.B. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 17301–17311.
112. Chrencik J.E., Brooun A., Recht M.I., Kraus M.L., Koolpe M., Kolatkar A.R., Bruce R.H., Martiny-Baron G., Widmer H., Pasquale E.B., Kuh P. // *Structure*. 2006. V. 14. P. 321–330.
113. van Geer M.A., Bakker C.T., Koizumi N., Mizuguchi H., Wesseling J. G., Oude Elferink R.P., Bosma P.J. // *World J. Gastroenterol.* 2009. V. 15. P. 2754–2762.
114. Martin T.J., Allan E.H., Ho P.W., Gooi J.H., Quinn J.M., Gillespie M.T., Krasnoperov V., Sims N.A. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 658. P. 51–60.
115. Martiny-Baron G., Korff T., Schaffner F., Esser N., Eggstein S., Marme D., Augustin H.G. // *Neoplasia*. 2004. V. 6. P. 248–257.
116. Kertesz N., Krasnoperov V., Reddy R., Leshanski L., Kumar S.R., Zozulya S., Gill P.S. // *Blood*. 2006. V. 107. P. 2330–2338.
117. Djokovic D., Trindade A., Gigante J., Badenes M., Silva L., Liu R., Li X., Gong M., Krasnoperov V., Gill P.S., Duarte A. // *BMC Cancer*. 2010. V. 10. P. 641.
118. Ehlken C., Martin G., Lange C., Gogaki E.G., Fiedler U., Schaffner F., Hansen L.L., Augustin H.G., Agostini H.T. // *Acta Ophthalmol.* 2009. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01609.x.
119. Maekawa H., Oike Y., Kanda S., Ito Y., Yamada Y., Kurihara H., Nagai R., Suda T. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. V. 23. P. 2008–2014.
120. Zamora D.O., Davies M.H., Planck S.R., Rosenbaum J.T., Powers M.R. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. V. 46. P. 2175–2182.
121. Davies M.H., Zamora D.O., Smith J.R., Powers M.R. // *Microvasc. Res.* 2009. V. 77. P. 382–386.
122. Kimura M., Kato Y., Sano D., Fujita K., Sakakibara A., Kondo N., Mikami Y., Tsukuda M. // *Int. J. Oncol.* 2009. V. 34. P. 321–327.
123. Pennisi A., Ling W., Li X., Khan S., Shaughnessy J.D., Jr., Barlogie B., Yaccoby S. // *Blood*. 2009. V. 114. P. 1803–1812.
124. Fuller T., Korff T., Kilian A., Dandekar G., Augustin H.G. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 2461–2470.
125. Huynh-Do U., Vindis C., Liu H., Cerretti D.P., McGrew J.T., Enriquez M., Chen J., Daniel T.O. // *J. Cell. Sci.* 2002. V. 115. P. 3073–3081.
126. Nakada M., Drake K.L., Nakada S., Niska J.A., Berens M.E. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 8492–8500.
127. Kojima T., Chang J.H., Azar D.T. // *Am. J. Pathol.* 2007. V. 170. P. 764–773.
128. Hafner C., Meyer S., Langmann T., Schmitz G., Bataille F., Hagen I., Becker B., Roesch A., Rogler G., Landthaler M., Vogt T. // *World J. Gastroenterol.* 2005. V. 11. P. 4024–4031.
129. Brantley D.M., Cheng N., Thompson E.J., Lin Q., Brekken R.A., Thorpe P.E., Muraoka R.S., Cerretti D.P., Pozzi A., Jackson D., Lin C., Chen J. // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 7011–7026.
130. Dobrzanski P., Hunter K., Jones-Bolin S., Chang H., Robinson C., Pritchard S., Zhao H., Ruggeri B. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 910–919.
131. Chen J., Hicks D., Brantley-Sieders D., Cheng N., McCollum G.W., Qi-Werdich X., Penn J. // *Exp. Eye. Res.* 2006. V. 82. P. 664–673.
132. Wykosky J., Gibo D.M., Debinski W. // *Mol. Cancer. Ther.* 2007. V. 6. P. 3208–3218.
133. Gobin A.M., Moon J.J., West J.L. // *Int. J. Nanomedicine*. 2008. V. 3. P. 351–358.
134. Carles-Kinch K., Kilpatrick K.E., Stewart J.C., Kinch M.S. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 2840–2847.
135. Gokmen-Polar Y., Toroni R.A., Hocevar B.A., Badve S., Zhao Q., Shen C., Bruckheimer E., Kinch M.S., Miller K.D. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2010. doi: 10.1007/s10549-010-1004-y. Springer.
136. Ansuini H., Meola A., Gunes Z., Paradisi V., Pezzanera M., Acali S., Santini C., Luzzago A., Mori F., Lazzaro D., Ciliberto G., Nicosia A., La Monica N., Vitelli A. // *J. Oncol.* 2009. P. 951917.
137. Lee J. W., Stone R.L., Lee S.J., Nam E.J., Roh J.W., Nick A.M., Han H.D., Shahzad M.M., Kim H.S., Mangala L.S., Jennings N.B., Mao S., Gooya J., Jackson D., Coleman R.L., Sood A.K. // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. P. 2562–2570.
138. Hammond S.A., Lutterbuese R., Roff S., Lutterbuese P., Schlereth B., Bruckheimer E., Kinch M.S., Coats S., Baeuerle P.A., Kufer P., Kiener P.A. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 3927–3935.
139. Vearing C., Lee F.T., Wimmer-Kleikamp S., Spirkoska V., To C., Stylianou C., Spanevello M., Brechbiel M., Boyd A.W., Scott A.M., Lackmann M. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. P. 6745–6754.
140. Nakada M., Anderson E.M., Demuth T., Nakada S., Reavie L.B., Drake K.L., Hoelzinger D.B.,

- Berens M.E.* // *Int. J. Cancer.* 2010. V. 126. P. 1155–1165.
141. *Mao W., Luis E., Ross S., Silva J., Tan C., Crowley C., Chui C., Franz G., Senter P., Koeppen H., Polakis P.* // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 781–788.
142. *Krasnoperov V., Kumar S.R., Ley E., Li X., Scehnet J., Liu R., Zozulya, S., Gill P.S.* // *Am. J. Pathol.* 2010. V. 176. P. 2029–2038.
143. *Spannuth W.A., Mangala L.S., Stone R.L., Carroll A.R., Nishimura M., Shahzad M.M., Lee S. J., Moreno-Smith M., Nick A.M., Liu R., Jennings N.B., Lin Y.G., Merritt W.M., Coleman R.L., Vivas-Mejia P.E., Zhou Y., Krasnoperov V., Lopez-Berestein G., Gill P.S., Sood A.K.* // *Mol. Cancer Ther.* 2010. V. 9. P. 2377–2388.
144. *Bonaparte M.I., Dimitrov A.S., Bossart K.N., Cramer G., Mungall B.A., Bishop K.A., Choudhry V., Dimitrov D.S., Wang L.F., Eaton A.B.T., Broder C.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 10652–10657.
145. *Yamaguchi S., Tatsumi T., Takehara T., Sakamori R., Uemura A., Mizushima T., Ohkawa K., Storkus W.J., Hayashi N.* // *Cancer.* 2007. V. 110. P. 1469–1477.
146. *Yamaguchi S., Tatsumi T., Takehara T., Sasakawa A., Hikita H., Kohga K., Uemura A., Sakamori R., Ohkawa K., Hayashi N.* // *Cancer Immunol. Immunother.* 2008. V. 57. P. 1861–1869.
147. *Jin M., Komohara Y., Shichijo S., Yamanaka R., Nikawa J., Itoh K., Yamada A.* // *Cancer Sci.* 2008. V. 99. P. 1656–1662.
148. *Yamaguchi S., Tatsumi T., Takehara T., Sasakawa A., Yamamoto M., Kohga K., Miyagi T., Kanto T., Hiramastu N., Akagi T., Akashi M., Hayashi N.* // *Cancer Immunol. Immunother.* 2010. V. 59. P. 759–767.
149. *Chen G., Wang Y., Zhou M., Shi H., Yu Z., Zhu Y., Yu F.* // *Oncol. Rep.* 2010. V. 23. P. 563–570.
150. *Nasreen N., Mohammed K.A., Antony V.B.* // *Cancer.* 2006. V. 107. P. 2425–2435.
151. *Oki M., Yamamoto H., Taniguchi H., Adachi Y., Imai K., Shinomura Y.* // *World. J. Gastroenterol.* 2008. V. 14. P. 5650–5656.
152. *Masood R., Xia G., Smith D.L., Scalia P., Still J.G., Tulpule A., Gill P.S.* // *Blood.* 2005. V. 105. P. 1310–1318.
153. *Mansson-Broberg A., Siddiqui A.J., Genander M., Grinnemo K.H., Hao X., Andersson A.B., Wardell E., Sylvén C., Corbascio M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 373. P. 355–359.
154. *Garber K.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 2010. V. 102. P. 1692–1694.
155. *Noren N.K., Pasquale E.B.* // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 3994–3997.

Eph Family Receptors as Therapeutic Targets

S. A. Zozulya*, * and I. P. Udovichenko**, ***

*Phone: +1 (858) 471-42-71; e-mail: sergey.zozulya@gmail.com

*ChemDiv, Inc., 6605 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA, 92121 USA

**Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Pushchino State University, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Anti-angiogenic therapy is currently a commonly accepted and rapidly developing approach in oncology and other pathologies linked to aberrant neovascularization. Discovery and validation of additional molecular targets in angiogenesis is needed due to the limitations of the existing clinical therapeutics inhibiting activity of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. A brief review of normal and pathological biological functions of the Eph family of receptor tyrosine kinases and their ephrin ligands is presented, and the approaches to developing therapeutics with anti- and pro-angiogenic and anti-tumor activity based on selective molecular modulation of Eph-ephrin signaling pairs are discussed. Functional roles of Eph-kinases and ephrins in such mechanisms of cancerogenesis as cell proliferation and invasion are also addressed.

Keywords: angiogenesis, anti-angiogenic therapy, oncology, tyrosine kinase, ephrin, Eph.