



自然科学基金项目进展专栏

论 文

多肽化学专刊

促红细胞生成素 B 螺旋表面肽的代谢稳定性结构修饰: 设计、合成及其提高的肾保护作用

彭电^{①②}, 许忠良^②, 杨橙^③, 戎瑞明^③, 朱同玉^{③*}, 龙亚秋^{②*}

① 长沙医学院药理学系, 长沙 410219

② 中国科学院受体结构与功能重点实验室; 中国科学院上海药物研究所药物化学实验室, 上海 201203

③ 上海市器官移植重点实验室; 复旦大学附属中山医院泌尿外科, 上海 200032

*通讯作者, E-mail: yqlong@simm.ac.cn; tyzhu@fudan.edu.cn

收稿日期: 2013-05-20; 接受日期: 2013-06-15; 网络版发表日期: 2013-06-21

doi: 10.1360/032013-180

摘要 肾脏缺血缺氧以及再灌注过程都将导致肾小管上皮细胞凋亡, 使肾功能严重受损. 肾脏的缺血再灌注损伤是移植肾功能延迟恢复的主要原因并能诱导急慢性排斥, 影响肾存活率. 近年来发现, 衍生于促红细胞生成素(EPO)的 B 螺旋亚基亲水表面序列的肽链(HBSP), 对肾脏缺血再灌注损伤具有显著的保护作用, 但其在体内极短的半衰期(约 2 min)极大地限制了它的临床应用. 因此, 本研究采用构象约束、全 D-构型氨基酸替换和 N-端封闭策略, 设计了 3 种类型的 EPO B 螺旋表面肽衍生物, 旨在提高其代谢稳定性. 环肽的设计采用了对氧化还原稳定的硫醚键和相对刚性的亚砷键两种环合方式. 在多肽的合成上, 采用微波辅助多肽自动合成和手工合成两种模式有机结合; 优化了硫醚环合工艺, 应用微波加热进行硫醚环肽的合成, 大大提高了产率和效率; 利用圆二色(CD)谱确定了亚砷环肽的相对构型. 活性实验表明, 相对于线性母肽 HBSP, 本文设计合成的代谢稳定衍生肽对大/小鼠肾脏缺血再灌注损伤均有显著提高的保护作用, 且硫醚和 R-构型亚砷环肽的肾脏保护活性强于 S-构型亚砷环肽. 而且, 环化确实提高了功能肽的血浆稳定性. 因此, 本文合成的硫醚环肽一周一次注射剂量等效于线性肽 HBSP 一日三次剂量对小鼠肾损伤的保护作用.

关键词环肽
代谢稳定
促红细胞生成素
微波辅助
多肽合成
缺血再灌注损伤
肾移植
组织保护作用

1 引言

肾脏缺血缺氧导致能量代谢不足和腺苷三磷酸(ATP)过度耗竭, 再灌注过程又产生大量氧自由基, 二者均可导致肾小管上皮细胞凋亡, 使肾功能严重受损^[1-5]. 临床上引起肾脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)的原因主要有心血管疾病、脓毒症、创伤、外科手术等. 近年来, 随着肾移植手术逐渐增加, 移植肾的缺血再灌注损伤可导致其功能

延迟恢复甚至慢性肾损伤, 严重影响手术效果和病人预后^[6-9]. 虽然肾脏 IRI 的实验及临床研究不断深入, 许多具有肾脏保护作用的药物被开发出来, 但总体上疗效均不确切^[10].

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)在临床上广泛用于改善尿毒症患者的肾性贫血^[11, 12], 近年来发现其具有显著的肾组织保护作用. 机理研究显示, EPO 在肾脏组织局部与受体结合后, 可通过多条信号途径抑制半胱天冬酶(caspase)活化、维持线粒体膜

电位、维持糖酵解及 ATP 合成, 从而减少肾小管上皮细胞凋亡^[13-15]。此外, EPO 亦能下调缺血再灌注损伤后肾组织局部的白介素 1 (IL-1)、白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 及巨噬细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 等炎症因子的表达, 明显抑制缺血后肾小管间质炎细胞浸润, 并通过 NF- κ B 途径下调肾组织局部炎症反应^[14, 16-18]。虽然 EPO 显示出良好的肾组织保护作用, 但同时也会带来血黏度增加、血栓形成及高血压等不良反应。而且, EPO 的组织保护作用呈剂量依赖性, 组织保护所需的剂量明显高于其发挥促红细胞生成作用所需的剂量, 使其不良反应发生的概率大大增加^[14]。

最近, Brines 等^[2]基于 EPO 及其受体相互作用的结构分析, 在 EPO 的 B 螺旋亚基亲水表面挑选出 11 个氨基酸残基合成线性多肽 helix B surface peptide (HBSP, 图 1)。HBSP 在动物模型中显示出良好的组织保护作用, 且无促红细胞生成的副作用。进一步机理研究表明, HBSP 可通过抑制细胞凋亡和炎症反应发挥肾脏缺血再灌注损伤的保护功能^[2, 5, 19, 20]。然而, 线性肽 HBSP 在血浆内易被肽酶降解, 其半衰期仅约 2 min, 极大地限制其临床应用^[2]。

构象约束的结构修饰是提高多肽对酶解抵抗性的有效手段^[21], 而且环化既能稳定活性肽的优势构象, 又能提高选择性。借鉴本课题组以前的肽结构修饰工作经验, 选取硫醚环合策略来构建 HBSP 环肽, 且硫醚键可进一步氧化为相对刚性的亚砷键。这两种环合策略既能稳定肽的二级结构, 又具有一定的柔韧性, 在提高酶解抵抗性的同时, 可以保持或提高肽配体与受体的亲和力^[22-24]。另一方面, 相对简单的全 D-氨基酸取代以及 N-端加帽(N-capping)也可有效增加肽链的代谢稳定性。因此, 本研究将采用以上 3 种策略对线性 HBSP 进行结构修饰(图 1), 并在大/小鼠肾脏缺血再灌注损伤模型中评估其活性。可喜的是, 对于肾脏缺血再灌注损伤的大/小鼠模型, 这些结构修饰的衍生肽对肾脏具有显著的保护作用, 活性均高于线性肽 HBSP。而且, 构型不同的手性亚砷连接键因为存在立体朝向问题, 所以导致 R 型亚砷环肽对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用要优于 S 型。进一步的血浆代谢稳定性实验也证实, 设计合成的硫醚环肽在人类血浆中非常稳定, 在实验检测的 300 min 内一直以原药形式存在, 未发现肽酶降解的发生。

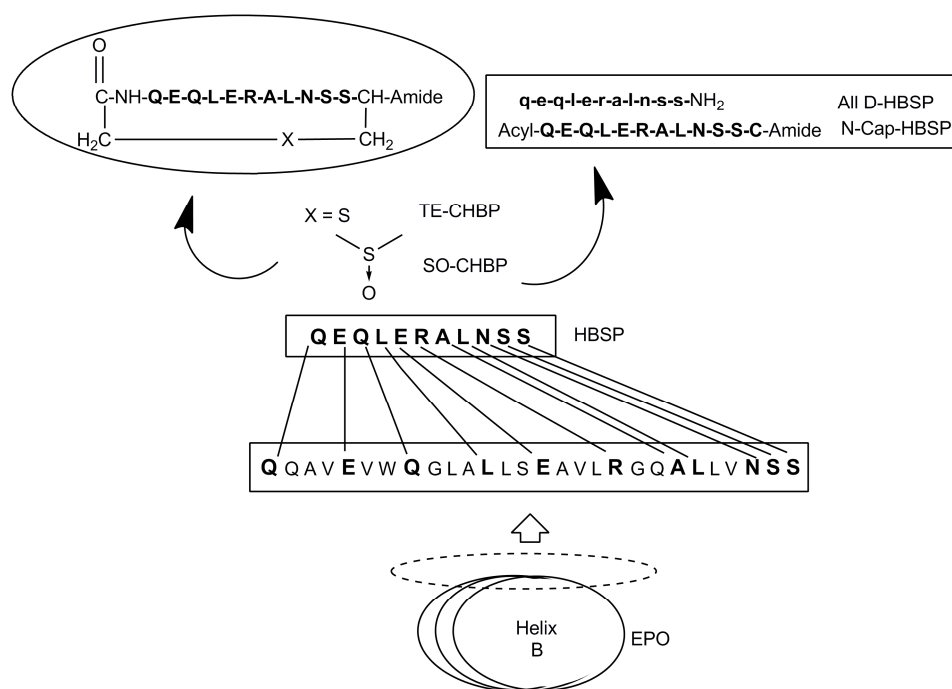


图 1 来源于 EPO 的 B 螺旋功能域的亲水表面同侧的 11 个氨基酸肽链(HBSP), 以及基于 HBSP 序列设计的 3 种类型结构修饰肽以提高其代谢稳定性

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

化合物的合成采用 CEM Liberty 1 微波多肽合成仪(CEM 公司, 美国)和人工合成两种方式, 多肽产物通过反相高效液相色谱分离纯化(RP-HPLC Waters 1525\2489\2707, Waters 公司, 美国), 结构通过电喷雾电离质谱(ESI-MS, Finnigan LCQ Deca, Thermo Finnigan 公司, 美国)鉴定. 目标化合物的纯度均大于 95%, 采用双溶剂系统高效液相色谱进行多肽纯度分析(系统 1, 溶剂组成 A: 0.05% 三氟乙酸(TFA)水溶液, 溶剂组成 B: 0.05% TFA 乙腈溶液; 系统 2, 溶剂组成 A: 0.05% TFA 水溶液, 溶剂组成 C: 0.05% TFA 甲醇溶液). 制备柱型号为: Vydac C18, 120A (10 × 250 mm); XBridge™ C18, 5 μmol/L, 19 × 150 mm, 225 或 210 nm 处紫外检测; 分析柱型号为: Sunfire™, C18, 3.5 μmol/L, 4.6×150 mm, 225 或 210 nm 处紫外检测. 环肽的圆二色谱(CD)用 Jasco J-810 型圆二色光谱仪测得, 使用光径为 1 mm 石英池, PBS (磷酸氢二钠和磷酸二氢钾混合溶液, pH 7.2)缓冲溶液作溶剂(多肽溶液浓度为 0.1 mmol/L).

所用树脂为 Rink Amide-MBHA resin, 天然和非天然氨基酸均采用 N^α-Fmoc 保护, 边链采用对酸敏感保护基 Gln(Trt)、Glu(tBu)、Arg(pbf)、Ser(tBu)和 Cys(Trt). 苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)/N,N-二异丙基乙胺(DIEA)作为偶联反应活化剂, DMF 作为偶联反应溶剂; 20%哌啶/N,N-二甲基甲酰胺(DMF) (v/v)和 0.1 N 1-羟基苯并三唑(HOBT)作为脱 N^α-Fmoc 试剂; TFA/1,2-乙二硫醇(EDT)/H₂O (95:2.5:2.5)作为切除树脂和脱边链保护基的裂解混合液(cleavage cocktail).

2.2 HBSP 衍生肽的合成

L-和 D-构型氨基酸开链肽由 CEM Liberty 1 微波多肽合成仪合成得到, 从 Rink Amide-MBHA resin 树脂(0.1 mmol)出发, 采用微波反应(37 W, 75 °C)去 N-端保护基. 偶联反应的微波功率设定为 27 W, 温度为 50 °C, 时间为 300 s. N-端封闭肽和环肽的肽链序列为 Q(Trt)-E(tBu)-Q(Trt)-L-E(tBu)-R(pbf)-A-L-N-S(tBu)-S(tBu)-C(Trt)-resin, 其中 Arg 需要两次偶联. 树脂上的多肽可进一步结构修饰, 也可用裂解试剂同时切

断树脂和脱边链保护得到线性肽链. 硫醚环肽和亚砷环肽的合成应用已发表的方法^[22, 23], 并进行工艺优化使合成产率稳定和高效.

2.2.1 N-端封闭的 HBSP 衍生肽(N-Cap-HBSP)

将序列组装完成的树脂上的多肽 Q(Trt)-E(tBu)-Q(Trt)-L-E(tBu)-R(pbf)-A-L-N-S(tBu)-S(tBu)-C(Trt)-resin 与氯乙酸酐在 N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)作用下偶联得到 N-端氯乙酰化的肽链, 然后其被裂解溶剂切断树脂并脱边链保护基. 粗肽在乙腈-水溶液中与 N-甲基吗啡啉发生亲核取代反应, 得到 N-端 4-甲基-4-(2-氧乙基)吗啡啉-4-鎗加帽的衍生肽 N-Cap-HBSP. ESI-MS *m/z*: 计算值 1517.7 (M)⁺, 实测值 1517.5; 保留时间 *t_R* = 11.46 min (溶剂 1 系统 10%~90%溶剂 B 梯度洗脱 30 min, 纯度 97.4%); *t_R* = 22.40 min (溶剂 2 系统 10%~90%溶剂 C 梯度洗脱 30 min, 纯度 96.8%).

2.2.2 全 D-构型 HBSP 衍生肽(All D-HBSP)

所有氨基酸均为 D-构型, 多肽序列为 q-e-q-l-e-r-a-l-n-s-s-amide. 全 D-HBSP, ESI-MS *m/z*: 计算值 1273.7 (M+H)⁺, 实测值 1273.8; *t_R* = 13.10 min (溶剂 1 系统 10%~90%溶剂 B 梯度洗脱 30 min, 纯度 98.4%); *t_R* = 21.90 min (溶剂 2 系统 10%~90%溶剂 C 梯度洗脱 30 min, 纯度 98.8%).

2.2.3 硫醚环合的 HBSP 衍生肽(TE-CHBP)

将树脂上的多肽 Q(Trt)-E(tBu)-Q(Trt)-L-E(tBu)-R(pbf)-A-L-N-S(tBu)-S(tBu)-C(Trt)-resin 依次用 DMF (2 mL × 6)、二氯甲烷(DCM, 2 mL × 6)清洗, 真空抽干, 然后加入裂解混合液(TFA/EDT/H₂O, 95:2.5:2.5), 反应体系于 30 °C 摇床上反应 2 h. 过滤, 收集滤液, 用少量 TFA 清洗树脂, 合并滤液. 滤液在氮气下浓缩至 1~2 mL, 然后加入 25 mL 冷乙醚, 有大量固体析出. 离心 8 min (3000 r/min), 倒出上层清液, 再加入冷乙醚, 反复此步骤 3 次, 得到多肽粗品.

将上述粗品溶于 H₂O/MeCN (1:1)中, 使其最终浓度为 10⁻² mol/L, 加入三乙胺将 pH 调至 9~10, 油浴加热下 65 °C 反应 12 h 或者微波下 75 °C 反应 20 min 即得到硫醚环肽, RP-HPLC 纯化, 冷冻干燥即得产品 TE-CHBP. ESI-MS *m/z*: 计算值 1416.7 (M+H)⁺, 实测值 1416.8; *t_R* = 15.01 min (溶剂 1 系统 10%~90%

溶剂 B 梯度洗脱 30 min, 纯度 98.9%); $t_R = 25.12$ min (溶剂 2 系统 10%~90% 溶剂 C 梯度洗脱 30 min, 纯度 98.4%).

2.2.4 亚砷环合的 HBSP 衍生肽(SO-CHBP)

硫醚环肽 TE-CHBP 溶解于 5% H_2O_2 水溶液中, 室温搅拌反应 6 h, 经 RP-HPLC 纯化, 冷冻干燥得到亚砷环肽(R)-SO-CHBP 和(S)-SO-CHBP. (R)-SO-CHBP, ESI-MS m/z : 计算值 1432.6 (M+H)⁺, 实测值 1432.7; $t_R = 14.011$ min (溶剂 1 系统 10%~90% 溶剂 B 梯度洗脱 30 min, 纯度 99.3%); $t_R = 24.993$ min (溶剂 2 系统 10%~90% 溶剂 C 梯度洗脱 30 min, 纯度 99.8%). (S)-SO-CHBP, ESI-MS m/z : 计算值 1432.6 (M+H)⁺, 实测值 1432.7; $t_R = 14.044$ min (溶剂 1 系统 10%~90% 溶剂 B 梯度洗脱 30 min, 纯度 98.4%); $t_R = 25.025$ min (溶剂 2 系统 10%~90% 溶剂 C 梯度洗脱 30 min, 纯度 99.0%).

2.3 代谢稳定性结构修饰的 HBSP 衍生肽对大/小鼠肾缺血再灌注损伤后肾功能的作用评估

清洁级雄性 SD 大鼠(200~250 g)及 SPF 级雄性 BALB/C 小鼠(20~25 g)均购自上海斯莱克实验动物有限公司. 大鼠/小鼠随机分为 6/7 组, 每组 6 只. 分别为: 假手术(sham)组、缺血再灌注(IR)对照组、线性肽 HBSP 治疗组及各类衍生肽治疗组.

2.3.1 大/小鼠肾缺血再灌注损伤模型的建立

腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(生理盐水稀释)50 mg/kg (购自上海中山医院实验动物实验中心)进行大/小鼠麻醉, 麻醉成功后将其固定于平板上, 沿中线切开腹壁进入腹腔, 仔细分离暴露右侧肾脏及肾蒂, 用无损伤血管夹夹闭肾蒂, 同法处理左侧肾脏及肾蒂. 肾蒂血管阻断 45 min (小鼠 30 min), 肾脏颜色变为紫黑说明血流阻断成功, 松开血管夹后肾脏出现花斑样改变, 颜色逐渐变红, 说明血流灌注恢复. 假手术组仅分离双侧肾脏及肾蒂, 不予以夹闭.

2.3.2 HBSP 衍生肽对大/小鼠肾 IRI 的保护作用

IR+HBSP 衍生肽治疗组于肾血流灌注恢复后即刻腹腔给予 8 nmol/kg 结构修饰肽 1 次, 非治疗组相应给予等量生理盐水. 术后 48 h 取血标本, 4500 r/min 离心 20 min, 取血清于全自动生化分析仪(日立, 日本)检测血清肌酐(Scr)及尿素氮(BUN)水平.

3 结果与讨论

3.1 促代谢稳定结构修饰肽的合成

衍生于 EPO 的 B 螺旋亚基亲水表面的 HBSP 肽链, 表现出对肾脏缺血再灌注损伤强效的组织保护作用, 但其在体内 2 min 的半衰期极大限制了它的临床应用. 本研究设计了 N-端封闭肽链、全 D-构型氨基酸序列、硫醚键环合和亚砷键环合的 HBSP 衍生肽, 旨在提高其代谢稳定性, 增强其体内肾脏保护作用. 应用微波协助的固相多肽合成技术, 得到了开链肽 N-Cap-HBSP 和全 D-HBSP, 两种环肽的合成如图 2 所示. 合成工艺的改进主要包括 N-端乙酰化、树脂切断以及环合等反应步骤.

N-端乙酰基的引入: 最初直接用氯乙酸酐法, 但树脂上的多肽酰胺化反应不完全. 考虑到反应时间过长或氯乙酸酐过量可能引起消旋化, 故在反应起始加入 2.5 N 的缩合剂 DIC, 结果酰胺化反应轻易地完成.

多肽的裂解: 首先尝试以硅烷为清除剂的裂解混合液 TFA/三乙基硅烷(TES)/ H_2O (9.5:0.25:0.25), 结果发现, 裂解产物比较复杂, 可能是肽链中的巯基易氧化所致. 后改用以乙二硫醇为清除剂的裂解混合液 TFA/EDT/ H_2O (9.5:0.25:0.25), 得到了高产率的目标产物. 同时发现, 温度对反应影响较大, 温度过低 Trt 保护基脱除不完全, 适宜条件为 30 °C 下反应 2 h.

环肽的形成: 肽链 C-端 Cys 的巯基边链亲核进攻 N-端的氯乙酰基发生分子内成环反应, 在无机碱体系($Na_2CO_3/NaHCO_3$)中该反应的产物极其复杂, 且反应重现性差. 于是, 本课题组尝试有机碱, 发现采用三乙胺调节体系的 pH 为 8~9, 环合反应在 65 °C 油浴加热下搅拌 12 h 可以高选择性高产率地得到硫醚环肽. 通过进一步优化反应条件总结出, 微波辅助下 75 °C 反应 20 min 也能高选择性高产率地得到目标环肽, 这也克服了油浴长时间加热多肽可能发生消旋化的问题. 有趣的是, 当加入 N-甲基吗啡啉作为碱时, 前体氯乙酰多肽的末端氯很容易被 N-甲基吗啡啉亲核取代形成 N-端季铵盐加帽的多肽 N-Cap-HBSP.

3.2 亚砷环肽构型的确定

由于亚砷具有手性, 所以由硫醚环肽 TE-CHBP

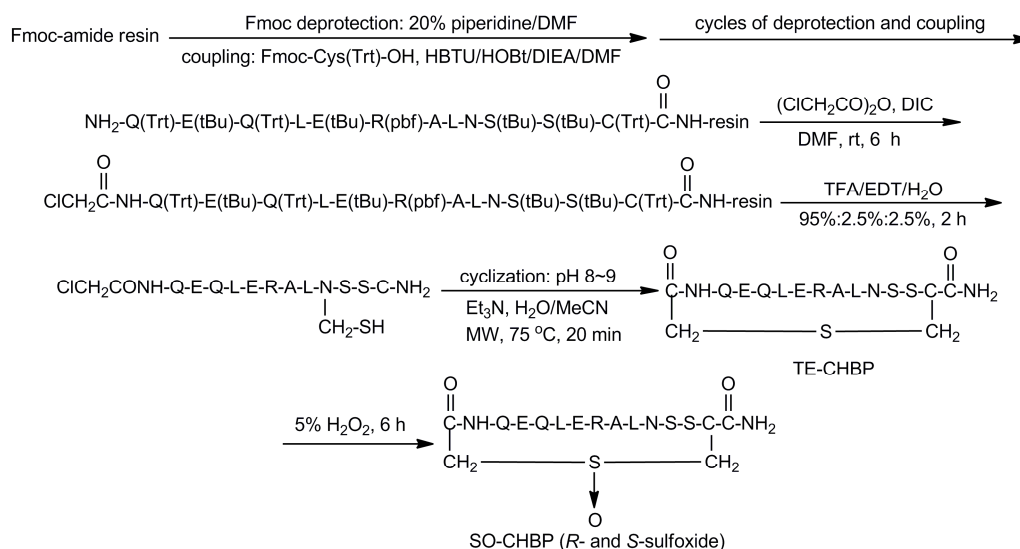


图 2 硫醚和亚砷环化的衍生肽的合成路线

氧化得到的亚砷环肽 SO-CHBP 为两个非对映异构体, 经 RP-HPLC 分离可得到两个组分 SO-CHBP-1 (极性较大) 和 SO-CHBP-2 (极性较小). 根据文献报道可知^[23, 25, 26], 亚砷在 220 nm 处呈现负 cotton 效应(-), 则为 *R* 构型; 呈现正 cotton 效应(+), 则为 *S* 构型. 从 CD 谱图 (图 3) 可以看出, 红色线 SO-CHBP-1 在 220 nm 处为负 cotton 效应, 故为 *R* 构型; 黑色线 SO-CHBP-2 在 220 nm 处为正 cotton 效应, 故为 *S* 构型.

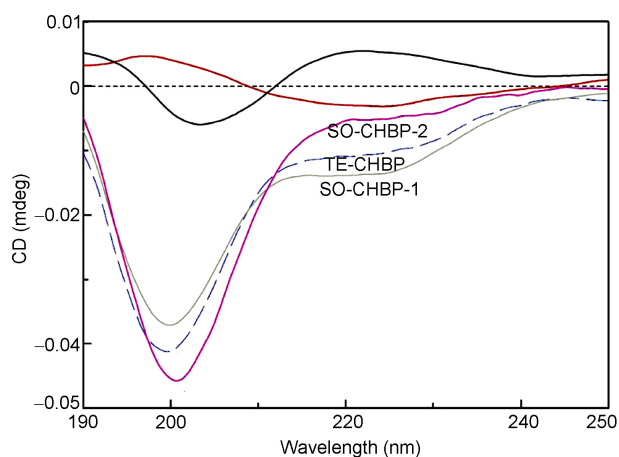


图 3 亚砷环肽 SO-CHBP 的 CD 谱图. 红色线为亚砷(SO-CHBP-1)对硫醚(TE-CHBP)作的差谱; 黑色线为亚砷(SO-CHBP-2)对硫醚(TE-CHBP)作的差谱

3.3 结构修饰衍生肽对大鼠/小鼠肾缺血再灌注损伤的肾功能的影响

首先测定了 3 个环肽(TE-CHBP、(*R*)-SO-CHBP 和(*S*)-SO-CHBP)在大鼠肾缺血再灌注损伤模型上对肾功能的影响. 结果显示, 再灌注后 48 h, IR 组肾功能明显受损, 其 Scr 及 BUN 含量明显高于 Sham 和 HBSP 组. 更为重要的是, 3 个环肽组的 Scr 及 BUN 均显著低于 IR 组, 而 TE-CHBP 和(*R*)-SO-CHBP 较 HBSP 肾功能保护作用更强, 且(*R*)-SO-CHBP 的活性优于(*S*)-构型. 另外, TE-CHBP 组 Scr 及 BUN 含量显著低于(*S*)-SO-CHBP 组, 亦轻微低于(*R*)-SO-CHBP 组, 但无统计学差异, 因此 TE-CHBP 的肾脏功能保护活性可能优于 SO-CHBP (图 4). 这些结果表明, 运用构象约束策略对线性多肽 HBSP 进行结构修饰以提高其代谢稳定性是有效的. 一方面, 环肽的酶解稳定性得到提高; 另一方面, 构象约束也有利于配体与受体的结合. 因此, 两方面因素共同使环肽对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用较开链肽 HBSP 显著增强.

本文在小鼠肾缺血再灌注损伤模型上, 进一步测试了 5 个衍生肽对肾功能的影响(图 5). 所有肽均显著降低了 Scr 和 BUN 含量, 相对于线性肽链 HBSP, 5 个肽均显示出增强的肾脏保护作用. 在 Scr 方面, 硫醚环肽仍然表现出优于亚砷环肽的肾功能保护活性, 提示刚性较强的亚砷环合键可能变动了必需氨

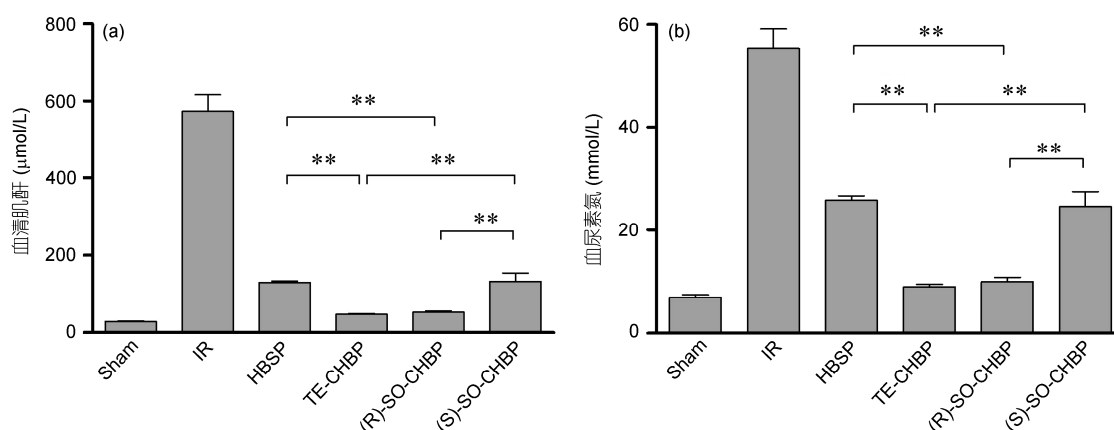


图 4 3 个环肽在大鼠肾缺血再灌注损伤后对血清肌酐(a)和尿素氮(b)含量的影响(**: $p < 0.01$)

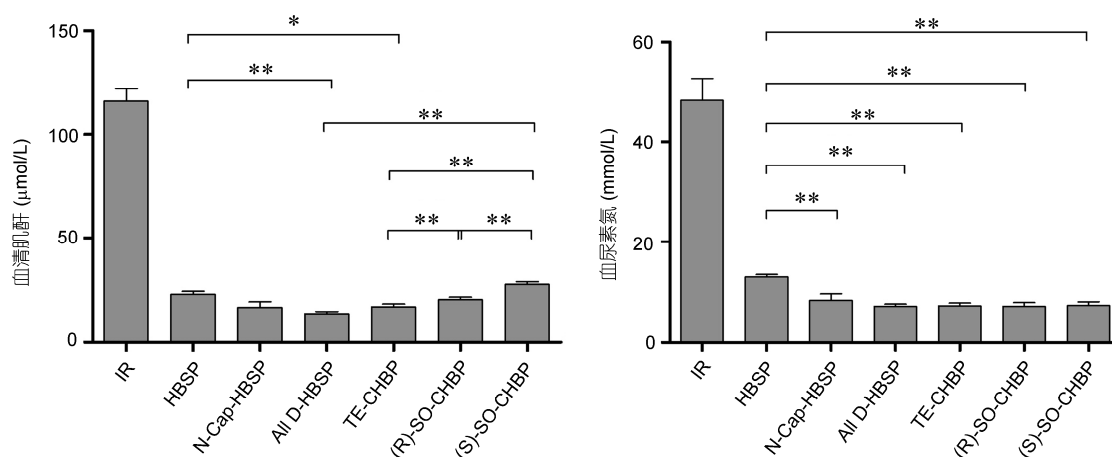


图 5 HBSP 衍生肽在小鼠肾缺血再灌注损伤后对血清肌酐(a)和尿素氮(b)含量的影响(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

基酸边链的空间朝向, 导致其活性有所降低. 有意思的是, 全 D-构型的线性肽 also 具有很好的肾脏功能保护作用, 主要源于其增强的酶解抵抗性, 其构象的柔韧性可能有助于关键氨基酸残基边链朝向于适合与受体蛋白相互作用的位置. 这表明, 在环肽的结构优化设计上增加其柔韧性可能有利于其活性的进一步提升.

在代谢稳定性测试中, 本课题组设计合成的硫醚环肽在人类血浆中非常稳定, 在实验检测的 300 min 内一直以原药形式存在, 未观察到酶解发生; 相对应地, 线性肽 HBSP 在人血浆中被快速降解, 表现出 9 min 的半衰期. 因此, 在小鼠缺血再灌注肾损伤模型中, 本课题组合成的硫醚环肽一周一次的注射剂量等效于线性肽 HBSP 一日三次剂量对小鼠肾损伤的保护作用.

4 结论

基于促红细胞生成素 B 螺旋亲水面的氨基酸序列, 本研究应用构象约束、全 D-构型氨基酸置换和 N-端加帽等策略, 设计合成了 5 种促代谢稳定的结构修饰肽. 利用微波辅助多肽合成技术, 优化了硫醚环合工艺, 微波辅助可以提高环合产率和效率; 利用 CD 谱确定了亚砷环肽的相对构型. 在大鼠和小鼠的肾缺血再灌注损伤模型中, 这些结构修饰肽对肾功能有显著的保护作用, 其活性明显高于线性肽链 HBSP. 令人感兴趣的是, 构象约束的 3 个环肽中, 硫醚环合的多肽对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用强于相对刚性的亚砷环肽; 且(R)-构型亚砷环肽的活性优于(S)-构型亚砷环肽. 在移植器官的组织保护应用中, 这些代谢稳定、活性提高的衍生肽有望减少用药剂量和次数, 展示了巨大的临床应用前景.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(81270832、81072527 和 81123004)以及上海市科学技术委员会基金(12ZR1405500)的资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, de Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*, 2002, 8: 495–505
- 2 Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, de Paola M, Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Sepodes B, Thiernemann C, Ghezzi P, Yamin M, Hand CC, Xie QW, Coleman T, Cerami A. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 10925–10930
- 3 Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Yilmaz O, Cerami A, Coleman T, Brines M. Nonerythropoietic tissue protective compounds are highly effective facilitators of wound healing. *Mol Med*, 2009, 15: 235–241
- 4 Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, Vergis AL, Ye H, Ju ST, Okusa MD. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20: 1744–1753
- 5 Patel NSA, Kerr-Peterson HL, Brines M, Collino M, Rogazzo M, Fantozzi R, Wood EG, Johnson FL, Yaqoob MM, Cerami A, Thiernemann C. Delayed administration of pyroglutamate helix B surface peptide (pHBSP), a novel nonerythropoietic analog of erythropoietin, attenuates acute kidney injury. *Mol Med*, 2012, 18: 719–727
- 6 Leventhal JS, Schroppel B. Toll-like receptors in transplantation: Sensing and reacting to injury. *Kidney Int*, 2012, 81: 826–832
- 7 Kentrup D, Reuter S, Schnockel U, Grabner A, Edemir B, Pavenstadt H, Schober O, Schafers M, Schlatter E, Bussemaker E. Hydroxyfasudil-mediated inhibition of ROCK1 and ROCK2 improves kidney function in rat renal acute ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*, 2011, 6: e26419
- 8 Pushpakumar SB, Perez-Abadia G, Soni C, Wan R, Todnem N, Patibandla PK, Fensterer T, Zhang QW, Barker JH, Maldonado C. Enhancing complement control on endothelial barrier reduces renal post-ischemia dysfunction. *J Surg Res*, 2011, 170: E263–E270
- 9 Gueler F, Rong S, Mengel M, Park JK, Kiyani J, Kirsch T, Dumluer I, Haller H, Shushakova N. Renal urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor but not uPA deficiency strongly attenuates ischemia reperfusion injury and acute kidney allograft rejection. *J Immunol*, 2008, 181: 1179–1189
- 10 Velly L, Pellegrini L, Guillet B, Bruder N, Pisano P. Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: A double-edged sword? *Pharmacol Ther*, 2010, 128: 445–459
- 11 Ishii Y, Sawada T, Murakami T, Sakuraoaka Y, Shiraki T, Shimizu A, Kubota K, Fuchinoue S, Teraoka S. Renoprotective effect of erythropoietin against ischaemia-reperfusion injury in a non-human primate model. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26: 1157–1162
- 12 Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: Reducing collateral damage from the primary injury response. *J Intern Med*, 2008, 264: 405–432
- 13 Yazihan N, Ataoglu H, Kavas GO, Akyurek N, Yener B, Aydm C. The Effect of K-ATP channel blockage during erythropoietin treatment in renal ischemia-reperfusion injury. *J Invest Surg*, 2008, 21: 340–347
- 14 Solling C, Christensen AT, Krag S, Frokiaer J, Wogensen L, Krog J, Tonnesen EK. Erythropoietin administration is associated with short-term improvement in glomerular filtration rate after ischemia-reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2011, 55: 185–195
- 15 Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19: 348–355
- 16 Ishii Y, Sawada T, Murakami T, Sakuraoaka Y, Shiraki T, Shimizu A, Kubota K, Fuchinoue S, Teraoka S. Renoprotective effect of erythropoietin against ischaemia-reperfusion injury in a non-human primate model. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26: 1157–1162
- 17 Kato M, Sawada T, Kita J, Shimoda M, Kubota K. Erythropoietin ameliorates early ischemia-reperfusion injury following the Pringle maneuver. *World J Gastroenterol*, 2010, 16: 4838–4845
- 18 Hu LK, Yang C, Zhao T, Xu M, Tang QY, Yang B, Rong RM, Zhu TY. Erythropoietin ameliorates renal ischemia and reperfusion injury via inhibiting tubulointerstitial inflammation. *J Surg Res*, 2012, 176: 260–266
- 19 Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Yilmaz O, Cerami A, Coleman T, Brines M. Nonerythropoietic tissue protective compounds are highly effective facilitators of wound healing. *Mol Med*, 2009, 15: 235–241
- 20 Yang C, Zhao T, Lin M, Zhao Z, Hu L, Jia Y, Xue Y, Xu M, Tang Q, Yang B, Rong R, Zhu T. Helix B surface peptide administered after insult of ischemia reperfusion improved renal function, structure and apoptosis through beta common receptor/erythropoietin receptor and PI3K/Akt pathway in a murine model. *Exp Biol Med*, 2013, 238: 111–119

- 21 Li P, Roller PP. Cyclization strategies in peptide derived drug design. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2: 325–341
- 22 Long YQ, Lung FD, Roller PP. Global optimization of conformational constraint on non-phosphorylated cyclic peptide antagonists of the Grb2-SH2 domain. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11: 3929–3936
- 23 Song YL, Peach ML, Roller PP, Qiu S, Wang SM, Long YQ. Discovery of a novel nonphosphorylated pentapeptide motif displaying high affinity for Grb2-SH2 domain by the utilization of 3'-substituted tyrosine derivatives. *J Med Chem*, 2006, 49: 1585–1596
- 24 Long YQ, Xue T, Song YL, Liu ZL, Huang SX, Yu Q. Synthesis and utilization of chiral alpha-methylated alpha-amino acids with a carboxyalkyl side chain in the design of novel Grb2-SH2 peptide inhibitors free of phosphotyrosine. *J Med Chem*, 2008, 51: 6371–6380
- 25 Jiang S, Liao C, Bindu L, Yin B, Worthy KW, Fisher RJ, Burke TR, Jr, Nicklaus MC, Roller PP. Discovery of thioether-bridged cyclic pentapeptides binding to Grb2-SH2 domain with high affinity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 2693–2698
- 26 Li P, Zhang M, Long YQ, Peach ML, Liu H, Yang D, Nicklaus M, Roller PP. Potent Grb2-SH2 domain antagonists not relying on phosphotyrosine mimics. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 2173–2177

Metabolically stabilized structural modification on the helix B surface peptide of erythropoietin: Design, synthesis and improved renoprotective effect

PENG Dian^{1,2}, XU ZhongLiang², YANG Cheng³, RONG RuiMing³, ZHU TongYu^{3*}, LONG YaQiu^{2*}

1 Department of Pharmacology, Changsha Medical College, Changsha 410219, China

2 CAS Key Laboratory of Receptor Research; Laboratory of Medicinal Chemistry, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

3 Shanghai Key Laboratory of Organ Transplantation; Department of Urology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

*Corresponding authors (email: yqlong@sim.ac.cn; tyzhu@fudan.edu.cn)

Abstract: Kidney ischemia reperfusion (IR) injury is a major cause of delayed graft function and can increase the risk of allograft rejection, affecting both short- and long-term graft survivals. It has been recently shown that helix B surface peptide (HBSP), an 11-amino acid long sequence derived from the aqueous surface of the helix B domain of erythropoietin, has powerful tissue protective function in various organs subjected to IR injury. However, the 2 min plasma half-life of HBSP restricts its application *in vivo*. In this study, conformationally constraining, all D-amino acid replacement and N-capping strategies were employed to modify the structure and thus improved the metabolic stability of the linear peptide HBSP. The redox-stable thioether and relatively rigid sulfoxide were chosen as the linkage to tether the 11-amino acid binding motif. For the synthesis of these peptide derivatives, microwave peptide synthesizer and manual solid peptide synthesis were combined to improve the efficiency. Especially, microwave assisted macrocyclization greatly facilitated the production of the thioether-cyclized peptide. The configuration of the chiral sulfoxide linkage was identified by CD spectra. Significantly, the renal functional assay in a murine kidney IR model indicated that these metabolically stabilized derivatives displayed improved renal protective effect compared to the linear parent peptide. Furthermore, the thioether-cyclized peptide was superior to the sulfoxide-cyclized peptide with respect to reducing the serum creatinine level. Therefore, the TE-CHBP with one dose in one week maintained equal renoprotective effect to the HBSP with 3 doses in one week in murine kidney ischemia reperfusion (IR) model.

Keywords: cyclic peptide, metabolic stability, erythropoietin, microwave-assisted, peptide synthesis, kidney ischemia reperfusion injury, renal transplanting, tissue protective effect