

抗菌肽药物工程化技术研究进展

汪小杰 毛若雨 王秀敏 滕达 王建华*

(中国农业科学院饲料研究所基因工程室 农业部饲料生物技术重点开放实验室 北京 100081)

摘要: 尽管抗生素在畜牧业疾病防治中的主导地位在短期内不会动摇,但病原菌耐药性形成与快速发展让抗菌肽成为近年新药研发热点之一。作为一种在生物体内广泛存在的天然免疫物质,抗菌肽具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等功能,由于药效短、对蛋白酶敏感、细胞毒性高等缺陷而限制其应用。本文综述了抗菌肽基因工程技术、聚乙二醇(PEG)化、靶向性改造和固定化等工程技术在抗菌肽新药开发中的应用研究进展,以促进抗菌肽产业化。

关键词: 抗菌肽, 基因工程, 聚乙二醇化, 靶向性, 固定化

Advances on antimicrobial peptide engineering

WANG Xiao-Jie MAO Ruo-Yu WANG Xiu-Min TENG Da WANG Jian-Hua*

(Key Laboratory of Feed Biotechnology of MOA, Gene Engineering Laboratory, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Although antibiotics hold a leading position in the medical treatment and animal husbandry, but its prone-resistance to the pathogen lead to the rise of research and development of antimicrobial peptides (AMPs). As natural active substances, AMPs have antibacterial, antiviral, anti-tumor and immune regulation function, while the shortcomings such as short efficacy, sensitive to proteinase and high cytotoxicity limit its application. In this paper, the bottlenecks and their solution of antimicrobial peptide engineering were reviewed in terms of gene engineering, PEGylation, targeting and immobilization in order to promote the industrialization of AMPs.

Keywords: Antimicrobial peptides, Gene engineering, PEGylation, Targeting, Immobilization

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是动物、植物以及微生物产生的一类对抗外界病原体的肽类活性物质,是一种免疫应答产物,分子量小、抗菌谱广、抗菌活性高、不易产生耐药性、无免疫原性。抗菌肽不像抗生素那样作用靶点较单一,除以细胞膜作为靶标外,还有众多胞内靶标,如抗菌肽

PR39 和 Indolicidin 既能抑制核酸和蛋白合成,又能干预细胞质膜隔膜形成^[1]。由于病原菌不易产生耐药性,抗菌肽显示作为新药开发潜力。迄今发现并鉴定的抗菌肽达 2 千余种,但很少进入临床应用,主要短板在于天然抗菌肽产量过低,且具有细胞毒性作用、半衰期短、抗菌谱过宽和对蛋白酶敏

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31372346, 31302004, 30972125); 科技支撑计划项目(No. 2013BAD10B02, 2011BAD26B02); 中国农业科学院农业科技创新工程抗菌肽及“抗生素替代品方向”(2013-2017)

*通讯作者: Tel: 86-10-82106081; ✉: wangjianhua@caas.cn, 2681298635@qq.com

收稿日期: 2014-01-02; 接受日期: 2014-03-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-17

感等产量和质量两方面的缺陷^[2]。针对上述问题, 本文选择抗菌肽基因工程、聚乙二醇(Polyethyleneglycol, PEG)化、靶向性和固定化等工程化技术研究的最新进展加以述评。

1 抗菌肽基因工程技术

旨在突破抗菌肽低产瓶颈的基因工程研究案例在 21 世纪快速增长, 取得了不少重要进展。在 10 多项国家基金资助下本小组在抗菌肽设计和转基因表达方面做了一些有益探索。在基于低毒性抗菌肽分子设计和构效关系研究中, 依据乳铁蛋白肽 Lfcin (W4,10), 幽门螺杆菌肽 HP (2-20)和天蚕素 Cecropin A 等母体肽特点, 设计构建杂合抗菌肽 LH28, 对 G^+ 菌如枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和 G^- 菌如大肠杆菌具有广谱抗菌性(MIC_{50} : 1.56–3.13 $\mu\text{mol/L}$), 尽管在高浓度(25 $\mu\text{mol/L}$)下溶血性显著上升达 42.09%, 但其在作用浓度范围内(3.13 $\mu\text{mol/L}$)溶血性很低(7.01%)^[3]。为了最大限度降低源于母体肽 LH28 的高溶血性, 适度保留其抗菌核心结构与功能, 我们尝试引入柔性接头(GGGGS)₃和高抗 G^+ 菌的抗菌肽 Plectasin, 设计构建杂合肽 LHP7, 发现其对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC 为 0.091 $\mu\text{mol/L}$, 较母体肽 LH28 降低 34.39 倍, 且该杂合肽溶血性极低, 即使在 1 000 mg/L 浓度条件下溶血率也低于 5%, 较 LH28 (35%)降低 6 倍^[4]。

在抗菌肽表达技巧方面, 通过十多年摸索, 本小组建立了一系列适合抗菌肽表达的技术体系, 包括: (1) 原核融合表达系统: 利用谷胱甘肽转移酶(Glutathione S-transferase, GST)标签, 表达融合蛋白 GST-Th-LfcinB, 凝血酶切割后每升培养物获 2 mg LfcinB^[5]; 利用硫氧还原蛋白(Thioredoxin, Trx)标签, 表达 Trx-乳铁蛋白两亲肽(Lfampin20)融合体 Trx-Xa-Lfampin20, 实现 Xa 因子柱上切割裂解^[6]; (2) 原核多聚体表达系统: 借助于 *Bbs* I 非对称粘性末端构建多聚体融合表达载体, 表达纯化后经甲酸切割获重组 LH28, 产量 11.3 mg/L^[7];

(3) 真核诱导型分泌表达系统: 在毕赤酵母中实现 Plectasin^[8]、NZ2114^[9]、SUMO 融合的海蚯蚓肽 NZ17074^[10]、杂合抗菌肽 LHP7^[4]和靶向抗菌肽 AgPlectasin^[11]的高效分泌表达, 产量分别达 748、3 500、61.8、906 和 1 285 mg/L, 达到产业化生产要求的表达水平, 有效降低了抗菌肽生产成本。其它抗菌肽基因工程研究案例很多, 例如采用枯草芽孢杆菌系统成功表达了天蚕素 AD^[12]、构巢曲霉系统成功表达了抗真菌蛋白 NFAP^[13]和乳酸杆菌系统成功表达了细菌素 SakacinA^[14]等。上述工作奠定了抗菌肽基因工程的主要材料和方法基础, 对各种抗菌肽转基因表达技术研发及产品制备方案的优化和选择有重要参考意义。相信随着研究的不断完善和深入, 基因工程将成为今后抗菌肽产业化关键制备途径之一。

2 抗菌肽的 PEG 化

抗菌肽聚乙二醇 PEG 化是改变杀菌活性、降低溶血性的有效手段。FDA 已批准 PEG 化蛋白药物进入临床应用^[15-16], 此类药物具有无毒性、无免疫原性及可溶于水和有机溶剂等特点。PEG 化蛋白药物可增加流体动力学体积、减少肾排泄率从而延长药物体内半衰期, 同时也降低蛋白酶降解机率。PEG 化蛋白药物在水及有机溶剂的良好可溶性使得生物相容性得以改善, 有效降低药物蛋白的聚集。已有多种 PEG 化蛋白药物用于临床, 据统计 20 世纪 90 年代上市的 PEG 化药物 Pegfilgrastim (Amgen 公司)和 Peginterferon α -2a (Roche 公司)产值达 55 亿美元/年, 几家带头公司在 21 世纪先后推出的治疗丙肝 C 的 Peginterferon- α 2b (Schering-Plough 公司)、治疗白血病的 Pegaspargase (Enzon 公司)、治疗老龄化相关黄斑病变(AMD)的 Pegaptanib sodium (OSI/Pfizer 公司)和治疗贫血症的 PEG-epoetin beta (Roche 公司)等 6 种 PEG 肽类药物产值达 15 亿美元/年以上^[17], PEG 化药物显示出良好的临床应用前景。在抗菌肽的 PEG 化研究方面, Morris 等发现 N 端 PEG₂ 化的杂合肽 CaLL

(抗菌肽 LL-37 和 Cecropin A 片段的杂合体)在肺衬液中对肺病原菌(炭疽杆菌 UM23-CL2、大肠杆菌 25922 以及金黄色葡萄球菌 29213)半数抑菌浓度升高了 2–10 倍,同时对肺上皮原代细胞毒性也大大降低^[16]。Zhang 等比较 PEG 化与未 PEG 化的抗菌肽 MA (抗菌肽 Melittin 中 12–24 位氨基酸残基的衍生片段)发现,PEG 化 MA 比对照稳定性有极大提高,在胰凝乳蛋白酶存在下,mPEG 750-MA、mPEG 1100-MA 比对照的半衰期分别延长了 3.2 和 4.7 倍,且在血清中 PEG 化 MA 比对照未 PEG 化 MA 的抗菌活性更高,同时对人红细胞毒性大为降低,如 30 $\mu\text{mol/L}$ 游离 MA 对红细胞溶血率达 100%,而 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 mPEG1100-MA 对红细胞溶血率低于 40%^[15]。上述关于药物 PEG 化的成功案例将鼓舞同行在平衡抗菌肽若干敏感性质(如非特异性广谱杀菌、强细胞毒性、药效期短和蛋白酶敏感性)的探索中加以积极借鉴。

3 抗菌肽靶向性变异体的设计与构建

抗菌肽的广谱杀菌特点往往会无差别性地伤害机体正常微生物菌群乃至机体细胞,是抗菌肽难以进入临床应用的一个重要难关。针对这一难题科学家们一直在积极探索,并取得良好进展:比如靶向抗菌肽 (Specifically targeted antimicrobial peptide, STAMP),其是由一个对病原菌具有种特异性的靶向结构域与一个高效杀菌的抗菌肽结构域为基础融合而成^[18],专杀目标病原菌,对正常宿主菌和其它非目标菌无作用。再如,基于免疫识别结合杀菌的抗体药物(Antibody drug)及其缀合物(Antibody drug conjugate, ADC)也是新近兴起的一类蛋白新药技术,尤其在肿瘤治疗上显示出良好前景,个别新药已进入临床,发展势头强劲。常用药物靶向制导的特殊分子有信息素、抗体、抗体可变区等^[19]。大量研究证明专杀假单胞菌、金黄色葡萄球菌、变异链球菌、肿瘤细胞、肠球菌、牙龈卟啉单胞菌的靶向抗菌肽或抗体药物均在实现专一性杀菌或肿瘤细胞的同时能够确保不杀伤机体内

正常菌群与细胞^[18,20-21]。本小组已成功构建由信息素引导的专杀金黄色葡萄球菌尤其是耐药性 MRSA 的导向抗菌肽^[11],积累了一些材料与方法,关于特异性识别结合杀菌分子检测等也在研究之中。这类技术已成为国际上蛋白类新药研发的主流热门技术之一,预期会不断有重大新药推出,值得同行关注和跟进。

此外,由于某些特殊结构的抗菌肽(如含 KRKR 的 β -Boomerang 结构)具有与病原菌胞壁成分 Lipid II 或 LPS 特异性识别结合的能力,以这些结构为基础可开发靶向抗菌肽。起初 Bhattacharjya 等发现这种能中和内毒素 LPS 的抗菌肽结合模体 ‘KRKR’^[22],继而设计并筛选得到了既具有抗菌能力又能中和内毒素的 β -Boomerang 肽 YI12WY,该肽能有效杀灭大肠杆菌、绿脓假单胞菌、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和枯草芽孢杆菌^[23]。Bhunia 等以 LBP、BPI、MD2 和 LALF 等 LPS 结合蛋白保守区域为模板构建并筛选得到了特征性 β -Boomerang 抗菌肽 YW12D (含 KRKR 模体),能够通过中和内毒素杀菌,且对红细胞溶解性很低,在 60 $\mu\text{mol/L}$ 时对红细胞的溶解性仅为 10%^[24]。扩大筛选 KRKR 的可识别病原菌受体范围或者筛选新的特异性识别受体的小分子是下一步新药研发的主要方向,具有重要的新药开发方法与材料意义。

另据报道,通过环化也能使部分抗菌肽抵御蛋白酶降解、减低溶血性和提高靶向性。Freder 等采用分子模拟技术设计了一系列环形阳离子肽,从中筛选得到了溶血活性低、杀菌能力强和靶向革兰氏阴性菌的靶向环化肽,其中 V1、V2 对大肠杆菌 ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 及志贺氏杆菌 ATCC25931 的 MIC 均低于 5 nmol/L,对红细胞的溶血性很低,其 EC_{50} 值分别高达 880 $\mu\text{mol/L}$ 和 589 $\mu\text{mol/L}$ ^[25]。这种肽环化技术只能用于化学合成途径而不能直接用于转基因表达。

以具有不同功能的特征抗菌肽实验案例取得

的数据为基础可以开发出新型抗菌肽设计软件, Ilić N. 等使用自主开发的 Designer 算法^[26]设计了一系列抗菌多肽, 优选的目标抗菌肽具靶向革兰氏阴性菌和低溶血性等优势, 显示 Designer 算法用于设计靶向抗菌肽的有效性。相信随着各种实验数据的增加和数据库的完善, 计算机辅助设计抗菌肽的方法会不断优化, 抗菌肽新产品也将不断增加。国内同行在此领域有分量和影响的报道不多, 需积极跟进。总之, 靶向抗菌肽、抗体肽、 β -Boomerang、环化肽等特异性的抗菌肽结构体能在不同程度上窄化抗菌谱、提高杀菌特异性、降低细胞毒性、稳定高级结构, 有理由乐观预计: 随着研究的深入, 这类新技术或新产品将有利于帮助抗菌肽成功走向临床应用。

4 抗菌肽的固定化

固定化技术最初源于 20 世纪初的固定化酶 (Immobilized enzyme) 技术, 主要特点是用物理或化学的方法使酶与水不溶性大分子载体结合或把酶包埋在其中, 固定化酶能持续性进行酶催化反应、并可回收及重复利用, 后衍生发展出固定化细胞、固定化微生物技术。近年有学者采用固定化技术成功克服抗菌肽的不稳定性, 对于通过破坏生物被膜杀菌的肽类药物具有重要的制剂工程化借鉴意义^[27-28]。生物被膜 (Biofilm) 是指微生物吸附于固形物表面, 由其自身分泌多糖、蛋白、核酸以及脂类等包被而形成分化的高密度细胞群体^[28]。生物被膜对环境压力, 如紫外辐射、pH 变化、渗透压、干燥等有很强抗性。生物被膜中不同微生物菌株之间的基因容易在抗性与非抗性菌株之间进行水平转移, 导致生物被膜对抗生素的抗性比相同浮游细胞高 10–1 000 倍, 而传统抗生素的亚治疗剂量易导致生物被膜形成^[28]。生物被膜一经形成就很难通过传统临床手段根除, 因此被膜是有效杀灭病原菌必须攻破的重要壁垒。据估计美国每年由于生物被膜导致各类感染达 75 万次, 造成约 16 亿美元损

失^[28]。近年应用抗菌药物包被技术减少生物被膜的形成、阻止病原菌的起始定殖一直是热点课题^[27,29]。例如, 包被于钛金属表面的万古霉素能有效杀灭金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌^[29], 但包被的传统抗生素则易在短期内产生耐药性^[30]。而以破坏膜为杀菌主要机制的抗菌肽, 通过固定化就能巧妙克服以上问题, 能增加抗菌肽稳定性、降低细胞毒性^[31-32]。Mohorčić 等将多粘菌素 B 固定于硅烷化玻片上, 24 h 内减少 5 个数量级的大肠杆菌^[33]。Willcox 等研究发现结合 500 μg 杂合肽 Melimine 的隐形眼镜减少 92% 铜绿假单胞菌或 76% 金黄色葡萄球菌的定殖, 共价结合 $18 \pm 4 \mu\text{g}$ 杂合肽 Melimine 的隐形眼镜减少铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌定殖率 70% 以上^[31]。Bagheri 等报道固定化抗菌肽显著降低红细胞溶血性, 抗菌肽 KLAL 对红细胞 EC_{25} 约 10 $\mu\text{mol/L}$, 而固定化 KLAL 在 MIC 浓度下对红细胞没有溶血性^[32], 聚苯乙烯固定的抗菌肽 6K8L 在 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 灭菌 20 min 或 200 $^\circ\text{C}$ 处理 30 min 不影响抗菌活性, 且在 pH 3.5–7.0 间均保持抗菌活性^[34]。

由于不同抗菌肽杀菌机理以及固定化基质存在多种多样, 为充分发挥抗菌肽用于防治病原微生物生物被膜形成的效果, 需针对不同病原菌、不同抗菌肽进行大量优化实验以筛得抗菌肽固定化最佳技术方案。总之抗菌肽固定化既能抑制生物被膜形成, 还能提高抗菌肽稳定性如耐高温和耐酸性环境、降低溶血性, 对于抗菌肽扬长避短进入临床大有可为, 值得尝试。而传统的固定化技术在抗菌肽新药研发中发挥如此重要的作用, 这种继往开来、推陈出新、可望可及的工作同样富有创新性, 更值得我们在提炼课题主题、设计创新方案的时候借鉴。

5 结束语

在抗生素耐药性日益严重、病毒感染和肿瘤日益威胁机体健康的今天, 抗菌肽的出现和研究为寻

找理想的抗菌、抗病毒和抗肿瘤药物提供了新的选择方案,但是抗菌肽种类众多,抗菌性质及杀菌机理多种多样,不同抗菌肽对不同病原菌的杀灭方式与机理各不相同,作者结合本小组十多年在此方向的研究体会认为下一步抗菌肽工程化工作重点至少应包括以下方面:(1)继续攻克主流抗菌肽的共性瓶颈,如药效短、对蛋白酶敏感、细胞毒性强、结构不稳定,上述基因工程、PEG化、靶向肽、抗体肽、固定化等工程化手段提供了备选技术方案,需要将技术节点精细化;(2)没有一种工程化措施是万能的,要针对具体抗菌肽、具体病原菌、具体受体宿主、具体工程化技术做一对一的适配性遴选与优化实验,以确保获得有针对性和差异性的抗菌肽制剂;(3)在研究和总结上述工程化技术共同特性、优缺点、相互关系与适用范围的同时,不断借鉴临近学科新发现和开发更有效的抗菌肽工程化新技术、新材料和新工艺。预期随着相关研发工作不断深入,一定会有力推进抗菌肽新药研发和临床化进程。

参 考 文 献

- [1] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(3): 238-250.
- [2] Vaara M. New approaches in peptide antibiotics[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2009, 9(5): 571-576.
- [3] Tian Z, Dong T, Teng D, et al. Design and characterization of novel hybrid peptides from LFB15(W4,10), HP(2-20), and cecropin A based on structure parameters by computer-aided method[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(6): 1097-1103.
- [4] Xi D, Teng D, Wang X, et al. Design, expression and characterization of the hybrid antimicrobial peptide LHP7, connected by a flexible linker, against *Staphylococcus* and *Streptococcus*[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(3): 453-461.
- [5] Feng X, Wang J, Shan A, et al. Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2006, 47(1): 110-117.
- [6] Yang Y, Tian Z, Teng D, et al. High-level production of a candidacidal peptide lactoferrampin in *Escherichia coli* by fusion expression[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 139(4): 326-331.
- [7] Tian Z, Teng D, Yang Y, et al. Multimerization and fusion expression of bovine lactoferricin derivative LfcinB15-W4,10 in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(1): 117-124.
- [8] Zhang J, Yang Y, Teng D, et al. Expression of plectasin in *Pichia pastoris* and its characterization as a new antimicrobial peptide against *Staphylococcus* and *Streptococcus*[J]. Protein Expression and Purification, 2011, 78(2): 189-196.
- [9] Zhang Y, Teng D, Mao R, et al. High expression of a plectasin-derived peptide NZ2114 in *Pichia pastoris* and its pharmacodynamics, postantibiotic and synergy against *Staphylococcus aureus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(2): 681-694.
- [10] Wang X, Wang X, Teng D, et al. Recombinant production of the antimicrobial peptide NZ17074 in *Pichia pastoris* using SUMO3 as a fusion partner[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(1): 71-78.
- [11] Mao R, Teng D, Wang X, et al. Design, expression, and characterization of a novel targeted plectasin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 3991-4002.
- [12] Chen X, Zhu F, Cao Y, et al. Novel expression vector for secretion of Cecropin AD in *Bacillus subtilis* with enhanced antimicrobial activity[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(9): 3683-3689.
- [13] Galgóczy L, Kovács L, Karácsony Z, et al. Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*[J]. Microbiology, 2013, 159(Pt2): 411-419.
- [14] Jiménez JJ, Borrero J, Diep DB, et al. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(9): 977-993.
- [15] Zhang G, Han B, Lin X, et al. Modification of antimicrobial peptide with low, molar mass poly (ethylene glycol)[J]. Journal of Biochemistry, 2008, 144(6): 781-788.
- [16] Morris CJ, Beck K, Fox MA, et al. Pegylation of antimicrobial peptides maintains the active peptide conformation, model membrane interactions, and antimicrobial activity while improving lung tissue biocompatibility following airway delivery[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(6): 3298-3308.
- [17] Veronese FM. PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications[M]. Die Deutsche Bibliothek: Birkhauser Verlag AG, 2009: 1-273.
- [18] Eckert R, He J, Yarbrough DK, et al. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided "smart" antimicrobial peptide[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(11): 3651-3657.
- [19] Devocelle M. Targeted antimicrobial peptides[J]. Frontiers in Immunology, 2012, 3: 1-4.
- [20] Eckert R, Qi F, Yarbrough DK, et al. Adding selectivity to antimicrobial peptides: rational design of a multidomain peptide against *Pseudomonas* spp.[J]. Antimicrobial

- Agents and Chemotherapy, 2006, 50(4): 1480-1488.
- [21] He J, Yarbrough DK, Kreth J, et al. Systematic approach to optimizing specifically targeted antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(5): 2143-2151.
- [22] Bhattacharjya S, Domadia PN, Bhunia A, et al. High-resolution solution structure of a designed peptide bound to lipopolysaccharide: transferred nuclear overhauser effects, micelle selectivity, and anti-endotoxic activity[J]. Biochemistry, 2007, 46(20): 5864-5874.
- [23] Bhattacharjya S. De novo designed lipopolysaccharide binding peptides: structure based development of antiendotoxic and antimicrobial drugs[J]. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17: 3080-3093.
- [24] Bhunia A, Chua GL, Domadia PN, et al. Interactions of a designed peptide with lipopolysaccharide: bound conformation and anti-endotoxic activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 369(3): 853-857.
- [25] Frecer V, Ho B, Ding J. De novo design of potent antimicrobial peptides[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(9): 3349-3357.
- [26] Ilić N, Novković M, Guida F, et al. Selective antimicrobial activity and mode of action of adeptantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1828(3): 1004-1012.
- [27] Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, et al. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(4): 1431-1440.
- [28] De Carvalho, CCR C. Biofilms: recent developments on an old battle[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2007, 1(1): 49-57.
- [29] Zhao L, Chu PK, Zhang Y, et al. Antibacterial coatings on titanium implants[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B, 2009, 91B(1): 470-480.
- [30] Palumbi SR. Humans as the world's greatest evolutionary force[J]. Science, 2001, 293(5536): 1786-1790.
- [31] Willcox MDP, Hume EBH, Aliwarga Y, et al. A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(6): 1817-1825.
- [32] Bagheri M, Beyermann M, Dathe M. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 53(3): 1132-1141.
- [33] Mohorčič M, Jerman I, Zorko M, et al. Surface with antimicrobial activity obtained through silane coating with covalently bound polymyxin B[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2010, 21(10): 2775-2782.
- [34] Appendini P, Hotchkiss J. Surface modification of poly (styrene) by the attachment of an antimicrobial peptide[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2001, 81(3): 609-616.