

吡啶 – 核定位序列偶联构建的高活性抗菌肽

Wei Zhang^{1,2#}, Xiaoli Yang^{1,2#}, Jingjing Song^{1,2}, Xin Zheng^{1,2}, Jianbo Chen^{1,2}, Panpan Ma^{1,2}, Bangzhi Zhang^{1,2*}, Rui Wang^{1,2*}

摘要: 多重耐药菌的出现迫切需要发现具有新作用机制的抗生素。在本研究中, 笔者将疏水的吡啶分子连接到核定位序列(NLS)的N末端合成了一种新型的抗菌药物 Acr₃-NLS。为了进一步提高该试剂的抗菌活性, 笔者将两个单体 Acr₃-NLS 分子通过二硫键连接合成了二聚体 (Acr₃-NLS)₂。结果显示, 与 NLS 相比, Acr₃-NLS, 特别是 (Acr₃-NLS)₂, 对革兰阴性菌和革兰阳性菌表现出显著的抗菌活性。随后, 其作用机制的研究表明, Acr₃-NLS 和 (Acr₃-NLS)₂ 可通过细胞膜破坏方式和 DNA 结合方式杀死细菌。作用于细胞膜和细胞内 DNA 的双靶点抑杀机制可以降低细菌对 Acr₃-NLS 和 (Acr₃-NLS)₂ 产生耐药性的风险。总之, 本研究提供了一种新的策略, 可用于设计具有双重作用机制的高效抗菌药物。

关键词: 吡啶, 核定位序列, 共轭连接, 抗菌活性, 作用机制

1 引言

全世界每年有数以百万计的人因细菌感染而患病。抗生素的发现对改善人类健康具有深远的影响。然而不幸的是, 随着耐药细菌菌株的不断出现, 传统抗生素的作用越来越小[1]。这迫切需要发现具有新型作用机制的抗生素。

猿猴空泡病毒40 (SV40) 大T抗原的核定位序列 (NLS, PKKKRKV) 是一种被广泛研究的多肽, 它可以促进异源分子的核运输[2–4]。据报道, NLS对革兰阴性菌和革兰阳性菌都表现出一定的抑杀活性, 但是其作用

机制仍然模糊, 并且其抗菌作用较差[5]。

吡啶(Acr)是一种杂环芳香族分子, 具有一定的DNA嵌入能力和药物活性[6]。大量的吡啶衍生物被合成并用作抗菌药物、抗疟药物和抗癌药物[7–10]。吡啶作为抗菌药物应用于临床最早出现于1917年[10]。具有强力治疗作用的青霉素类药物的出现, 使得吡啶在抗菌治疗中黯然失色。然而, 随着抗生素耐药性问题的日益严重, 人们重新将目光聚焦在了吡啶类药物上[10]。

将小分子药物连接到多肽上已经被证明是一种有效的策略。该方法具有诸多益处, 如增加了药物的水溶性, 提高了药代动力学, 并且可以克服耐药性问题[11, 12]。在本研究中, 笔者通过将吡啶分子连接到NLS中合成了一类新型高效的抗菌药物。笔者通过将三个Lys(acridine)分子连接到NLS序列的N末端合成了Acr₃-NLS。二聚化被认为是一种提高抗菌肽的抗菌活性和酶解稳定性的有效策略[13, 14]。因此, 为了提高药物的抗菌活性, 笔者还将两个Acr₃-NLS单体分子的C末端通过二硫键连接合成了二聚体(Acr₃-NLS)₂。这种方法已经被广泛应用于药物共轭连接[15]。图1所示为这些偶联物的结构式。随后, 笔者对Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂的抗菌活性和作用机制进行了研究。

2 材料和方法

2.1 肽的合成和纯化

NLS和Acr₃-NLS是在

-

甲苯氨胺(MBHA)树脂

¹ Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ² Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

[#] These authors contributed equally to this work

* Correspondence authors. E-mails: zhangbz@lzu.edu.cn, wangrui@lzu.edu.cn

Received 13 October 2015; received in revised form 22 November 2015; accepted 26 November 2015

© The Author(s) 2015. Published by Engineering Sciences Press. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
Engineering 2015, 1(4): 500–505

引用本文: Wei Zhang, Xiaoli Yang, Jingjing Song, Xin Zheng, Jianbo Chen, Panpan Ma, Bangzhi Zhang, Rui Wang. Conjugation with Acridines Turns Nuclear Localization Sequence into Highly Active Antimicrobial Peptide. *Engineering*, DOI 10.15302/J-ENG-2015106

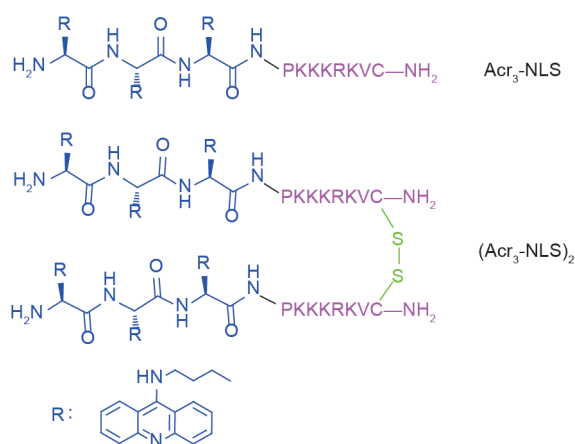


图 1. $Acr_3\text{-NLS}$ 和 $(Acr_3\text{-NLS})_2$ 的结构。

基础上采用标准的Fmoc化学合成策略进行合成得到的。同时按照已发表的文献中报道的合成方法 [16], 将Fmoc-Lys(acridine)作为一种氨基酸合成并连接到多肽上。 $(Acr_3\text{-NLS})_2$ 的合成是根据笔者之前报道的步骤进行的[17]。所有的粗肽都使用C18柱并通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)进行纯化, 然后通过电喷雾电离质谱(ESI-MS)进行鉴定。通过对RP-HPLC检测结果进行纯度分析, 多肽洗脱体系的洗脱剂是线性梯度为含有0.1%三氟乙酸的5%~95%的乙腈, 洗脱时间为30 min, 流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。每种多肽的保留时间(RT)由其最大峰值决定。

2.2 抗菌活性测定

革兰阴性菌(大肠杆菌, ATCC 25922; 绿脓杆菌, ATCC 27853)和革兰阳性菌(枯草芽孢杆菌, ATCC 23857; 金黄色葡萄球菌, ATCC 25923)都是在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下利用Mueller-Hinton(MH)液体培养基进行培养的。药物对革兰阴性菌和革兰阳性菌的抗菌活性均使用标准连续稀释法进行测定。简而言之, 将菌液用MH培养基稀释到 $10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加入到96孔培养板中。然后将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 经两倍稀释之后的药物(浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $128\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)加入到96孔培养板中。培养18~20 h后, 对最小抑制浓度(MIC)进行测定。以不含有药物的培养基作为对照组。实验测定重复3次。

2.3 杀菌动力学实验

通过杀菌动力学实验检测多肽偶联物对大肠杆菌的杀伤效力。将生长至对数期的大肠杆菌用MH液体培养基稀释至 $10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。之后分别将含有0.5倍、1倍、2倍MIC偶联物的溶液添加到细菌悬浮液中。分别在0、15 min、30 min、60 min、90 min和120 min时收集 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细菌悬浮液并用培养基进行稀释, 然后涂布到MH

琼脂平板上。在培养24 h之后进行菌落计数。该实验重复测定3次。

2.4 碘化丙啶摄取测定

笔者利用碘化丙啶(PI)的摄取实验来测定方法偶联物的膜裂解活性。将生长至对数期的大肠杆菌用MH液体培养基稀释至 $10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将 1 mL 含有浓度为 $1\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大肠杆菌的磷酸盐缓冲液(PBS)添加到培养皿中, 同时加入1倍MIC的偶联物溶液, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下进行共同孵育。孵育不同时间后, 加入PI, 并进一步培养10 min, 之后使用激光共聚焦扫描显微镜进行PI摄取测定。

2.5 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜(SEM)样品准备过程中需对大肠杆菌细胞进行洗涤, 并以 $5\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度重悬于PBS中, 与偶联物溶液(1倍MIC)在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下共孵育1 h。随后, 将细胞置于 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速下离心5 min, 并加入3%的戊二醛在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下将其固定。将所有固定好的细胞在2.5%的单宁酸(Sigma)溶液中浸泡2 d, 再使用2%的四氧化锇(Sigma)固定2 h, 随后在乙醇中进行脱水, 并在临界点干燥器中进行干燥(Ion Tech, Teddington)。用金镀层后, 使用电子显微镜(JSM-6380Lv)对大肠杆菌进行观察。

2.6 溶血实验

采集小鼠的新鲜血液, 离心去除白细胞层, 并使用PBS将得到的红细胞洗涤3次, 分别以 $1000g$ (g 为重力加速度, $g=9.8\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)的速度离心10 min, 并重悬于PBS中至4%(V/V)。将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含有各种浓度偶联物的溶液加入到盛有 $100\text{ }\mu\text{L}$ 红细胞悬浮液的96孔板中。分别用PBS和0.1%的Triton X-100处理细胞作为0和100%的溶血。在孵育1 h之后, 将96孔板以 $1000g$ 的速度离心10 min, 并吸取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 上清液转移到另一个96孔板中。用酶标仪检测450 nm波长下的吸光值, 从而计算血红蛋白的释放率。

2.7 DNA结合分析

凝胶阻滞实验能够用来评估偶联物对DNA的结合能力。使用TIANamp细菌DNA提取试剂盒可获得大肠杆菌ATCC 25922的基因组DNA。将 $10\text{ }\mu\text{L}$ 基因组DNA(约400 ng)溶解在TE缓冲液中, 之后与含有不同浓度偶联物的溶液进行等体积混合。将反应混合物置于室温条件下孵育30 min。然后将混合物和TE缓冲液置于1%琼脂糖

凝胶中进行凝胶电泳。通过溴化乙锭的荧光检测DNA的迁移情况。

2.8 偶联物的细胞摄取

将大肠杆菌细胞与0.5倍MIC的偶联物溶液共孵育培养1 h。然后用PBS将细胞洗涤3次。使用倒置的Zeiss LSM 710共聚焦显微镜进行成像。激发波长为405 nm,最大发射波长为487 nm。在采集荧光通道图像的同时采集微分干涉对比(DIC)图像。

3 结果与讨论

3.1 偶联物抗菌活性

多重耐药菌的出现引发了对具有新作用机制的新型抗生素替代物的迫切需求。在本研究中,笔者将吡啶分子连接到NLS的N末端合成了一种新型的抗菌制剂,通过用两种革兰阴性菌(大肠杆菌和绿脓杆菌)和两种革兰阳性菌(枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌)检测了所合成药物的抗菌活性。表1总结了所有药物的MIC。尽管有报道称NLS具有抗菌活性[5],但是笔者的研究结果表明它并不能在测试的浓度范围内杀死细菌。正如所期望的那样,与NLS相比, $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和二聚体 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 对革兰阴性菌和革兰阳性菌都表现出了显著的抗菌活性。更重要的是,二聚体 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 的抗菌活性显著高于 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 。随后,笔者研究了 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和二聚体 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 的杀菌动力学。如图2所示,研究结果表明, $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和二聚体 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 都可以在短时间内杀死细菌,尤其是在高浓度条件下。此外,在相同的MIC条件下,二聚体 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 的杀菌能力显著高于 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 。基于快速杀菌特性和理化性质,笔者推断 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和二聚体 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 可以像大多数抗菌肽那样,通过破坏细胞膜杀死细菌[18, 19]

表 1. 核定位序列 (NLS) 及其含吡啶衍生物的氨基酸序列、理化性质和抗菌活性

Peptide	M_{calc}^* ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	M_{obs}^{**} ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	t_R^s (min)	MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
				<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
NLS	984.6	985.6	11.4	> 128	> 128	> 128	> 128
$\text{Acr}_3\text{-NLS}$	1901.7	1901.1	14.3	16	64	16	16
$(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$	3801.4	3801.2	15.0	8	16	8	8
9-chloroacridine	—	—	—	> 128	> 128	> 128	> 128

注文: * 单一同位素摩尔质量计算值。 ** 单一同位素质量观察值。 t_R^s 表示疏水性,其值通过 PR-HPLC 测量获得。

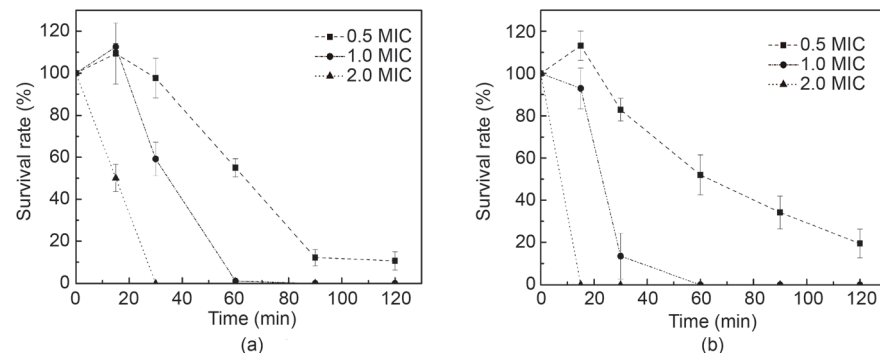


图 2. (a) $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和 (b) $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 的杀菌动力学。实验重复进行 3 次。

3.2 偶联物的膜裂解活性

抗菌肽是一类具有广谱抗菌活性的阳离子短肽,一般含有50%的疏水性残基[19]。与具有特定靶点的传统抗生素不同的是,抗菌肽通过一系列物理过程选择性结合并破坏带负电荷的细菌细胞膜,而不会作用于中性的哺乳动物细胞膜[18]。

首先,笔者采用PI摄取实验(这是一种研究抗菌肽膜破坏能力的经典方法)测量了 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和二聚体 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 对细胞膜的损伤。PI是一种荧光分子,它不能进入膜完整的细胞内,但是却可以通过被破坏的细胞膜。如图3所示,结果表明细菌经过 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 处理后,PI可以迅速进入大肠杆菌细胞内,这表明大肠杆菌的细胞膜被破坏了。笔者通过SEM观察了经 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 处理后的大肠杆菌细胞膜的细微变化。如图4所示,用偶联物处理后的大肠杆菌细胞膜表面有若干的泡形成,这可能代表细胞膜表面形成了孔洞,相比而言,未经处理的大肠杆菌细胞膜表面正常光滑。经SEM观察得出的结果与PI摄取实验得出的结果相同,进一步确认了 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 能够像诸多天然存在的抗菌肽一样通过破坏细胞膜来杀死细菌。膜裂解活性使 $\text{Acr}_3\text{-NLS}$ 和 $(\text{Acr}_3\text{-NLS})_2$ 具有以下优势:与传统抗生素不同,它们可以通过细胞膜破坏机制杀灭耐药细菌;细菌很难对具有细胞膜破坏机制的药物产生抗性,因为细菌几乎无法重建细胞膜体系。

阳离子性和疏水性在抗菌肽的膜裂解活性中发挥了重要作用[20-22]。正电荷使抗菌肽能够通过静电作用吸附到细菌细胞膜上,而疏水性能够促进抗菌肽插入到疏水细胞膜中[23]。正电荷和疏水性的适度增加有利于提高抗菌肽的膜裂解活性和抗菌活性[19, 21, 24]。本研究中的NLS是一

种含有5个碱性氨基酸(4个赖氨酸和1个精氨酸)和一个疏水性氨基酸的阳离子多肽。因此,由于NLS疏水性较差,

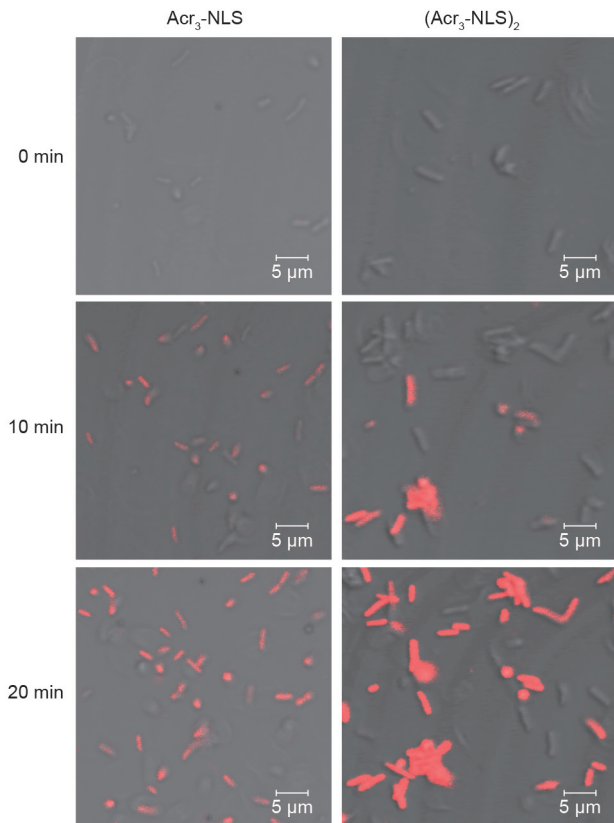


图3. 利用 Acr_3-NLS 和 $(Acr_3-NLS)_2$ 在 1 倍 MIC 下处理大肠杆菌后在不同时间点上的 PI 摄取量。

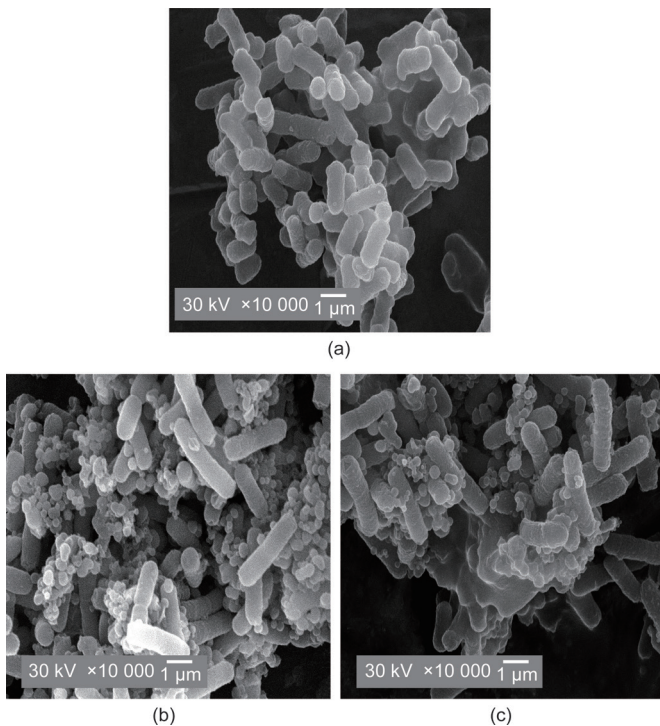


图4. 大肠杆菌的扫描电子显微镜图像。(a) 对照; (b) 经 Acr_3-NLS 处理; (c) 经 $(Acr_3-NLS)_2$ 处理。抗菌肽在 1 倍 MIC 下对细菌处理 1 h。对照菌不做抗菌肽处理。比例尺为 1 μm 。

它很难插入到细胞膜中,也不会形成稳定的微孔[25]。在之前的研究中,笔者发现加入疏水性的喜树碱可以将亲水性的细胞穿膜肽变成细胞膜裂解性多肽[26]。在本研究中,吡啶可以作为—种理想的疏水性基团,用于增加偶联物的细胞膜插入能力和膜裂解能力,从而增强其抗菌活性。为了测量吡啶对抗菌肽疏水性的增强作用,笔者采用RP-HPLC测定了多肽的保留时间(t_R),这是一种检测多肽疏水性的有效方法[24]。如表1所示,与NLS相比, Acr_3-NLS 的保留时间显著延长,这表明 Acr_3-NLS 的疏水性高于NLS。因此,通过末端连接Lys(acridine)可以显著提高 Acr_3-NLS 的疏水性,从而提高细胞膜裂解活性。同样地,二聚体 $(Acr_3-NLS)_2$ 比单体 Acr_3-NLS 表现出更高的疏水性和抗菌活性。

3.3 偶联物的溶血活性

对宿主细胞的低毒性是抗菌肽药物临床开发的一个非常重要的指标。溶血实验是衡量抗菌肽毒性最常用的方法[27]。疏水性的增强通常会增加抗菌肽和红细胞膜的相互作用,导致溶血活性的增强[24]。尽管 Acr_3-NLS 与NLS相比具有更强的疏水性,但是 Acr_3-NLS 即使在 $200 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的浓度下也未表现出明显的溶血活性,这个浓度远高于其MIC值(图5)。尽管有研究表明二聚体可以增强抗菌肽的溶血性,但是二聚体 $(Acr_3-NLS)_2$ 的溶血活性与单体 Acr_3-NLS 相比并没有明显提高。总之,笔者的研究结果表明 Acr_3-NLS 和 $(Acr_3-NLS)_2$ 表现出低细胞毒性,这就意味着该药物在感染的治疗过程中可以使用更高的浓度。

3.4 偶联物的 DNA 结合活性

最近,越来越多的研究表明细胞膜破坏并非是抗菌肽的唯一作用机制。据报道,一些抗菌肽可以作用于细

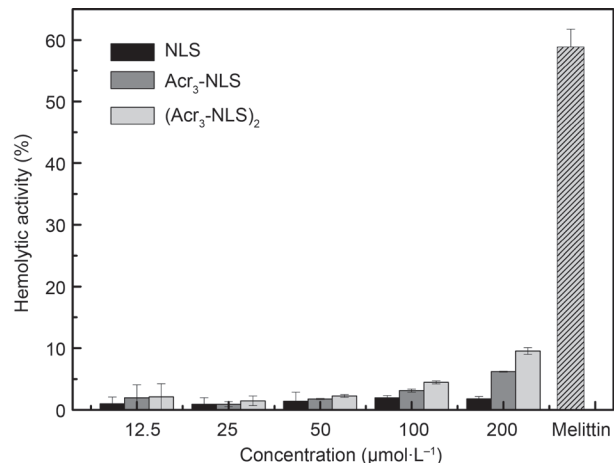


图5. NLS、 Acr_3-NLS 和 $(Acr_3-NLS)_2$ 的溶血活性。阳性对照为经浓度为 $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的蜂毒肽处理的细胞。实验重复测定 3 次。

胞内的一个或多个靶点从而杀死细菌，如作用于核酸和酶[29, 30]。与其他细胞内靶点相比，阳离子抗菌肽更容易攻击阴离子核酸从而导致细菌死亡[30]。在笔者之前的研究中，NK-18作为一种来源于NK-溶解素的短链肽，不仅可以通过破坏细菌细胞膜杀死细菌，还可以通过结合细菌DNA杀死细菌[31]。因为细菌内的核酸是吡啶类抗菌药物的作用靶点[10]，笔者推测含有吡啶分子的Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂也可以通过将其结合到细菌DNA上并干扰细菌DNA的合成来杀死细菌。

首先，笔者通过凝胶阻滞分析检测了多肽的核酸结合能力。如图6所示，与NLS相比，Acr₃-NLS尤其是(Acr₃-NLS)₂能够引起细菌DNA迁移率的显著改变，这就意味着吡啶的存在显著地增强了Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂的DNA结合能力。然而，为了能够和DNA相互作用，Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂必须首先穿过细胞膜。有趣的是，由于抗菌肽和穿膜肽在电荷、结构和膜作用方式上存在很多相似之处，越来越多的研究表明许多抗菌肽也能够穿过细胞膜进入到细胞内[32]。尽管据报道，NLS可以穿透核膜屏障并促进核转位，但是很少有报道显示它能够穿透细胞膜。在本研究中，笔者使用共聚焦显微镜观察发现Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂能够进入到大肠杆菌细胞内。如图7所示，Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂都能穿透细胞膜并在大肠杆菌细胞内蓄积。根据上述结果，笔者可以推断，Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂可以通过破坏细胞膜并干扰细菌DNA的合成来杀死细菌。双靶点作用机制——作用于细胞膜和细胞内DNA——降低了细菌对Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂产生耐药的可能性，因为产生耐药性需要改变细胞膜或是绕过许多生化路径，而这些对细菌而言是一件非常困难的事情。

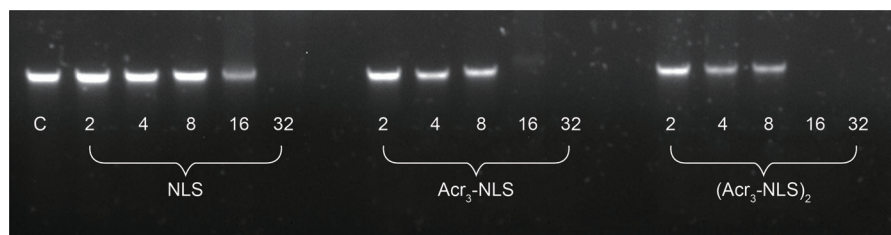


图6. NLS、Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂的DNA结合能力。通过对DNA迁移阻滞的检测来分析多肽的DNA结合能力。

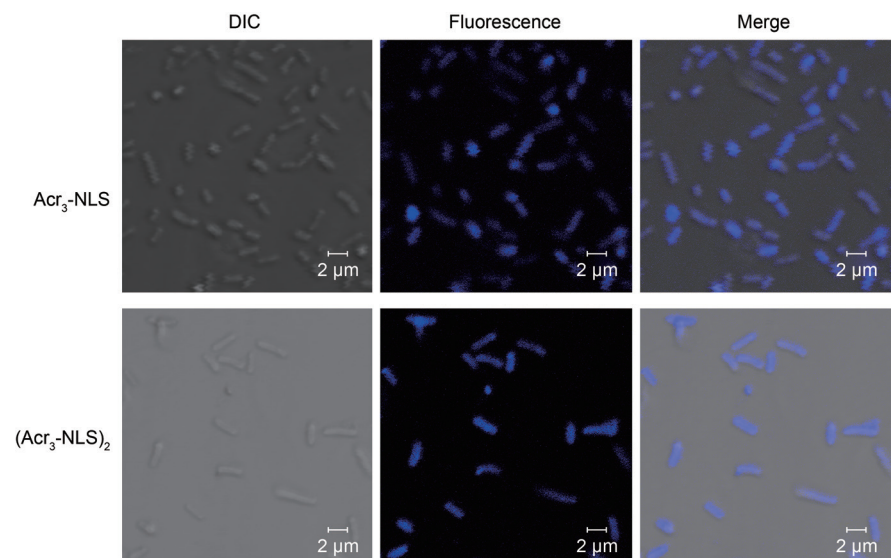


图7. 大肠杆菌在0.5倍MIC下处理1 h后，NLS、Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂的细胞摄入。

4 结论

在本研究中，笔者通过将吡啶分子连接到NLS中合成了一种新型抗菌肽。这类抗菌肽可以通过双重作用机制杀死细菌：吡啶可以作为一种膜锚定分子而提高Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂的细胞膜裂解活性，并且还可以增强它们的DNA结合能力，从而提高它们的抗菌活性。因此，Acr₃-NLS和(Acr₃-NLS)₂可以有效杀死细菌，并且不容易受到已知细菌耐药性的影响。尽管系统评估这些药物的应用潜力还需要进一步的工作，但是本研究为设计具有多重作用机制的新型抗菌药物提供了一种新的改造策略。

致谢

笔者感谢国家自然科学基金(81402776, 81202400)、中国科学技术部国家科技重大专项“重大新药创制”(2012ZX09504-001-003)、中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2014-142, lzujbky-2015-169)、高等学校博士学科点专项科研基金(20130211130005)和中国博士后科学基金(2013T60896)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Wei Zhang, Xiaoli Yang, Jingjing Song, Xin Zheng, Jianbo Chen, Panpan Ma, Bangzhi Zhang, and Rui Wang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

1. M. S. Butler, M. A. Blaskovich, M. A. Cooper. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J. Antibiot.*, 2013, 66(10): 571–591
2. C. W. Pouton, K. M. Wagstaff, D. M. Roth, G. W. Moseley, D. A. Jans. Targeted delivery to the nucleus. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, 59(8): 698–717
3. L. J. Brandén, A. J. Mohamed, C. I. Smith. A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17(8): 784–787
4. T. Shiraishi, R. Hamzavi, P. E. Nielsen. Targeted delivery of plasmid DNA into the nucleus of cells via nuclear localization signal peptide conjugated to DNA intercalating bis- and trisacridines. *Bioconjug. Chem.*, 2005, 16(5): 1112–1116
5. N. Kobayashi, Y. Yamada, T. Yoshida. Nuclear translocation peptides as antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50(3): 1118–1119
6. J. Feigon, W. A. Denny, W. Leupin, D. R. Kearns. Interactions of antitumor drugs with natural DNA: ¹H NMR study of binding mode and kinetics. *J. Med. Chem.*, 1984, 27(4): 450–465
7. R. Kumar, M. Kaur, M. Kumari. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. *Acta Pol. Pharm.*, 2012, 69(1): 3–9
8. G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, A. M. Kołodziejczyk. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: Their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacol. Rep.*, 2011, 63(2): 305–336
9. A. F. Valdés. Acridine and acridinones: Old and new structures with anti-malarial activity. *Open Med. Chem. J.*, 2011, 5: 11–20
10. M. Wainwright. Acridine—A neglected antibacterial chromophore. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, 47(1): 1–13
11. S. Majumdar, T. J. Siahaan. Peptide-mediated targeted drug delivery. *Med. Res. Rev.*, 2012, 32(3): 637–658
12. V. M. Ahrens, K. Bellmann-Sickert, A. G. Beck-Sickinger. Peptides and peptide conjugates: Therapeutics on the upward path. *Future Med. Chem.*, 2012, 4(12): 1567–1586
13. A. Pini, et al. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49(7): 2665–2672
14. E. N. Lorenzón, et al. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, 56(6): 3004–3010
15. J. Wang, S. Li, T. Luo, C. Wang, J. Zhao. Disulfide linkage: A potent strategy in tumor-targeting drug discovery. *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19(18): 2976–2983
16. N. J. Baumhover, K. Anderson, C. A. Fernandez, K. G. Rice. Synthesis and *in vitro* testing of new potent polyacridine-melittin gene delivery peptides. *Bioconjug. Chem.*, 2010, 21(1): 74–83
17. J. Song, et al. Design of an acid-activated antimicrobial peptide for tumor therapy. *Mol. Pharm.*, 2013, 10(8): 2934–2941
18. M. Zasloff. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415(6870): 389–395
19. M. R. Yeaman, N. Y. Yount. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, 2003, 55(1): 27–55
20. A. Schmidtchen, M. Pasupuleti, M. Malmsten. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Adv. Colloid. Interfac.*, 2014, 205: 265–274
21. Z. Jiang, A. I. Vasil, J. D. Hale, R. E. W. Hancock, M. L. Vasil, R. S. Hodges. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 2008, 90(3): 369–383
22. L. M. Yin, M. A. Edwards, J. Li, C. M. Yip, C. M. Deber. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(10): 7738–7745
23. N. Sitaram, R. Nagaraj. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1462(1–2): 29–54
24. Y. Chen, M. T. Guarnieri, A. I. Vasil, M. L. Vasil, C. T. Mant, R. S. Hodges. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51(4): 1398–1406
25. T. Tachi, R. F. Epanand, R. M. Epanand, K. Matsuzaki. Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity. *Biochemistry*, 2002, 41(34): 10723–10731
26. J. Song, et al. Cell penetrating peptide TAT can kill cancer cells via membrane disruption after attachment of camptothecin. *Peptides*, 2015, 63: 143–149
27. L. H. Kondejewski, et al. Dissociation of antimicrobial and hemolytic activities in cyclic peptide diastereomers by systematic alterations in amphipathicity. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(19): 13181–13192
28. C. E. Dempsey, S. Ueno, M. B. Avison. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. *Biochemistry*, 2003, 42(2): 402–409
29. K. A. Brogden. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, 3(3): 238–250
30. P. Nicolas. Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.*, 2009, 276(22): 6483–6496
31. J. Yan, et al. Two hits are better than one: Membrane-active and DNA binding-related double-action mechanism of NK-18, a novel antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, 57(1): 220–228
32. S. T. Henriques, M. N. Melo, M. A. R. B. Castanho. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: How different are they? *Biochem. J.*, 2006, 399(1): 1–7