

DOI: 10.13376/j.cblls/2014109

文章编号: 1004-0374(2014)07-0773-06

## 真菌防御素plectasin研究进展

王梅, 刘娃, 朱赫, 宋玉竹\*

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

**摘要:** 抗生素耐受现象日益严重, 迫切需要研发新型抗菌药物。Plectasin 是第一例报道的真菌防御素, 其抗菌谱窄, 仅对革兰氏阳性菌具有强大的杀菌活性, 对其进行结构改造可进一步提高其抗菌作用特异性。Plectasin 抗菌机制明晰, 作用于细胞壁合成。其药物代谢动力学研究较为透彻, 同时可在体外高产量表达且活性更高。这些研究为其应用提供了理论基础。综上, plectasin 具有极大的临床应用潜力。

**关键词:** plectasin; 抗菌活性; 药代动力学

**中图分类号:** Q516; R978.1 **文献标志码:** A

## Research advances in plectasin, a fungal defensin

WANG Mei, LIU Wa, ZHU He, SONG Yu-Zhu\*

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** With the growing antibiotic resistance, there are urgent demands to develop novel antimicrobial agents. Plectasin is the first reported fungal defensin with strong and specific bactericidal activity against gram-positive bacteria. Structural reconstruction to plectasin can enhance its specificity to bacteria. It can inhibit synthesis of cell wall, to further kill bacteria. Moreover, there are many studies about its pharmacokinetics and *in vitro* expression with high yields and high activity. All these results provide a theoretical basis for its clinical application. Accordingly, plectasin has great potential to be developed as an antimicrobial agent.

**Key words:** plectasin; bactericidal activity; pharmacokinetics

抗生素对感染性疾病的治疗发挥了重要作用, 但由于抗生素滥用, 耐药菌株不断增加, 现已出现多种超级细菌, 如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、耐万古霉素的金黄色葡萄球菌 (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)<sup>[1-3]</sup>, 因而寻找新型抗菌物质取代或辅助传统抗生素以应对细菌耐药性问题至关重要。抗菌肽因具有高效杀菌活性和独特的作用机制, 被认为是有望投入临床使用的新型抗菌物质之一。

抗菌肽来源广泛, 在哺乳动物、昆虫、鱼类、两栖动物、植物、真菌等自然界的大多数物种中均有存在。防御素 (defensins) 是广泛存在于生物体中的一类内源性抗菌肽, 富含半胱氨酸, 具有抗细菌、真菌、病毒、肿瘤等功能, 在抵御病原感染中发挥

重要作用<sup>[4]</sup>。Plectasin 是 2005 年 Mygind 等<sup>[5]</sup> 从腐生子囊菌 (*Pseudoplectania nigrella*) 的分泌蛋白中分离的首例真菌防御素。Plectasin 对革兰氏阳性细菌具有广谱抗菌活性, 与传统抗生素之间不存在交叉耐受性, 作用机制清晰, 且对人的细胞没有毒害作用<sup>[6]</sup>, 这些特性使 plectasin 具有极大的临床应用潜力。目前, 关于 plectasin 的功能、作用机理、基因工程表达、结构改造及药代动力学分析等方面已有广泛的研究, 为 plectasin 的临床应用奠定了坚实的理论基础。

收稿日期: 2013-10-09; 修回日期: 2013-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000960); 云南省科技创新平台计划 (2012DA002)

\*通信作者: E-mail: yuzhusong@kmust.edu.cn; Tel: 0871-65939528

## 1 Plectasin的结构

Plectasin 的一级、二级和三级结构与蜘蛛、蝎子、蜻蜓、贻贝防御素的结构相似 (图 1)<sup>[7-8]</sup>。Plectasin 前体由 95 个氨基酸残基组成, 包含信号肽序列(1~23 位残基)、前片段(24~55 位残基)和 40 个氨基酸残基组成的成熟肽(56~95 位残基)。成熟的 plectasin 相对分子质量为 4.4 kDa, 含有 5 个赖氨酸、2 个组氨酸和一个阴离子四肽 (DEDD) 以及 6 个半胱氨酸 (形成三对二硫键, 配对方式为 C1-C4, C2-C5, C3-C6)。其与无脊椎动物的防御素具有 50%~55% 的相似性, 与哺乳动物的  $\alpha$ - 和  $\beta$ - 防御素无相似性。Plectasin 的净电荷在 +1 与 +3 之间变化, 这主要取决于序列中两个组氨酸的离子状态, 等电点为 7.77, 中性条件下溶解度低。Plectasin 的二级结构由 N-末端的一个  $\alpha$ -螺旋、C-末端两个反平行的  $\beta$ -折叠以及两者之间的 Loop 区组成。核磁共振光谱 (NMR) 和 X-射线晶体学研究显示, plectasin 的空间结构由三个结构域组成 (N-末端 Loop 环、两亲性  $\alpha$ -螺旋中心、C-末端为两条反向平行的  $\beta$ -折叠), 形成典型的 CS $\alpha$  $\beta$  基序。其中  $\alpha$ -螺旋通过两对二硫键与  $\beta$ -折叠的一条链稳定相连, 而 N-末端的 Loop 环则通过一对二硫键与  $\beta$ -片层的另一条链相连<sup>[9-11]</sup>(见图 1)。2008 年, Zhu<sup>[12]</sup> 通过生物信息学手段鉴定得到 25 种真菌防御素类似肽, 为揭示防御素类抗菌肽的遗传进化奠定了基础, 进一步分析显示菌丝

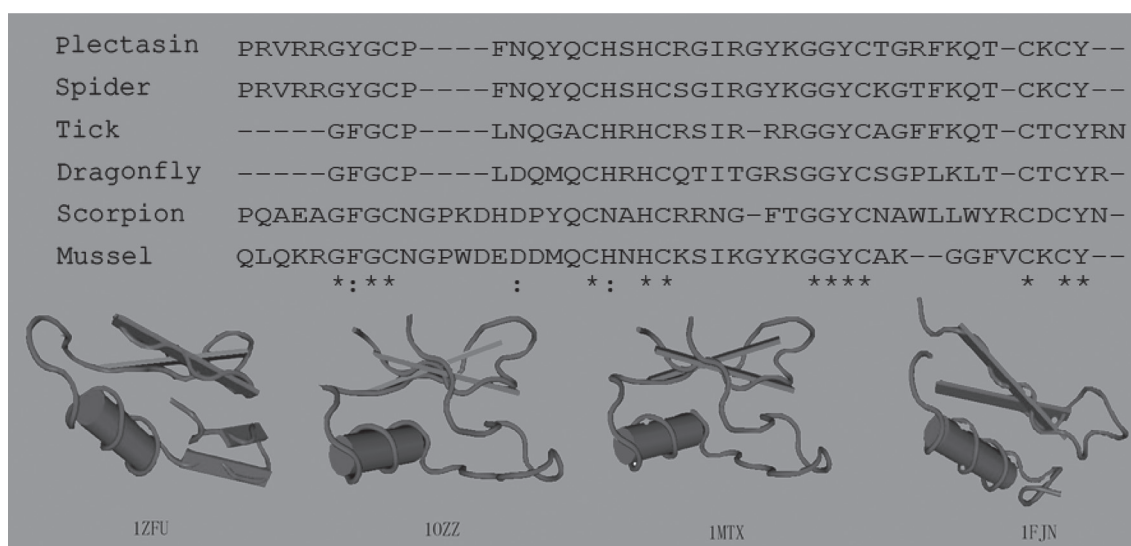
霉素属于 AITDs (antibacterial ancient invertebrate-type defensins), 可能处于防御素起源的早期阶段。

## 2 Plectasin的生物学活性

抗菌肽对真菌、原虫、病毒及癌细胞具有广谱高效生物活性, 因而具有广泛的应用前景, 但也有学者指出抗菌肽的广谱生物活性可能会导致正常菌群的失衡, 引起严重的治疗后并发症等副作用<sup>[13-15]</sup>。Plectasin 抗菌谱较窄, 仅对革兰氏阳性菌有活性。经改造后的类似物 NZ2114 和 Agplectasin (rAgP) 抗菌谱比 plectasin 更窄, 甚至专一作用于 *S. aureus*, 低浓度下杀菌效率高<sup>[16]</sup>。这种特性可用于窄谱抗菌物质的开发。

### 2.1 Plectasin的抗菌活性

体外研究表明, plectasin 对几种革兰氏阳性细菌具有抗菌活性, 特别是肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、*S. aureus*、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*), 包括临床分离的 90 种不同血清型的 *S. pneumoniae* 和临床耐药菌株<sup>[5]</sup>。Plectasin 对 MRSA 的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentrations, MICs) 为 16~32 mg/L, 而对单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的 MIC 值为 64 mg/L<sup>[17]</sup>。Plectasin 对敏感菌株的 MICs 和最小杀菌浓度 (minimal bactericidal concentrations, MBCs) 值相一致, 表明它具有杀菌活性<sup>[17]</sup>。此外, 重组的 plectasin 具有良好的理化稳定性, 在 pH 2.0~10.0 范围内对 *S. aureus* 具



Spider: AB041815.1; Tick: FJ222579.1; Dragonfly: P80154; Scorpion: P41965和1MTX; Plectasin: Q53106和1ZFU; Mussel: JN036432.1和1FJN; Butterfly: 1OZZ1ZFU; Mussel: JN036432.1和1FJN; Butterfly: 1OZZ。

图1 Plectasin与无脊椎动物防御素的结构相似性

有抑菌活性; 100 °C 处理 1 h 后仍可抵抗木瓜蛋白酶和胃蛋白酶的降解<sup>[18]</sup>。

在小鼠模型中, plectasin 能有效治疗由肺炎链球菌引起的腹膜炎和肺炎, 与青霉素和万古霉素的杀菌效果相当。注入单剂量的 plectasin 分子可明显增强动物的生存能力, 并能快速减轻机体负担<sup>[19]</sup>。更重要的是, plectasin 在生理离子强度下也具有杀菌作用, 而大多数脊椎动物防御素只有在体外非常低的离子强度下才会发挥作用, 这对于 plectasin 在临床上的开发应用具有重要的意义。

## 2.2 NZ2114的抗菌活性

NZ2114 是 plectasin 结构改造后的类似物, 相比于 plectasin 有 3 个氨基酸的改变 (D9N、M13L、Q14R)<sup>[20]</sup>。NZ2114 对葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、*S. pneumoniae*、溶血性链球菌 (*Streptococcus hemolyticus*) 的体外抗菌活性优于 plectasin<sup>[21-22]</sup>。对甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) 和 MRSA, NZ2114 的活性是 plectasin 两到三倍。与传统的抗生素相比, NZ2114 的活性 (0.028~0.9 μmol/L) 比氨苄青霉素 (1.35~172.50 μmol/L) 和万古霉素 (0.71~5.67 μmol/L) 强, 同时还拥有抗生素后效应 (postantibiotic effect, PAE)<sup>[23]</sup>。此外, NZ2114 发挥作用迅速, 可于 2 h 内杀死 90% 以上 *S. aureus* (ATCC25923) 和 99% 的 MRSA (ATCC43300), 且在一些动物模型如兔脑膜炎、鼠腹膜炎、鼠腿部感染中具有良好的效果; 在实验兔感染性心内膜炎 (IE) 模型中, 对 MRSA 株 (ATCC33591) 的疗效比万古霉素好, 与达托霉素相似, 停药后未引起细菌复发, 而万古霉素与达托霉素停药后细菌数继续增加<sup>[22]</sup>。NZ2114 因其抗菌谱窄、低浓度下杀菌效率高, 可作为预防和治疗 *S. aureus* 感染的一种新型潜在抗微生物药剂, 特别是用于 MRSA 导致的感染。

## 2.3 rAgP (Agplectasin)的抗菌活性

rAgP (Agplectasin) 是将 AgrD1 信息素融合到 plectasin 氨基末端的新颖特异性的靶标抗菌肽<sup>[24]</sup>。Agr 可调节葡萄球菌胞外蛋白的生成, 包括胞外酶、毒素、表面蛋白和其他毒性因子<sup>[25]</sup>。绝大多数 *S. aureus* 含有 AgrD1 信息素, 这是选择 AgrD1 作为靶标区域的主要原因<sup>[26]</sup>。rAgP 具有突出的靶向能力, 能特异性地杀灭 *S. aureus*, 而对 *S. epidermidis* 和益生菌, 如乳酸链球菌 (*Streptococcus lactis*)、凝结芽胞杆菌 (*Bacillus coagulans*) 几乎无影响。同时, rAgP 对 *S. aureus* 的高特异性可以降低杀菌所需的有效浓度, 从而最大限度地降低使用剂量<sup>[27]</sup>。rAgP

对 MRSA、*S. aureus* 等 20 个临床菌株也具有高的杀菌活性, 其 MICs 范围为 0.37~2.96 μmol/L。rAgP 在 MH 培养基或人血液中 10 h 内, 几乎杀死所有 *S. aureus* (ATCC25923) 和 MRSA (ATCC43300)。与 plectasin 类似, rAgP 在大范围 pH 值和温度下同样具有相对稳定和较好的抗菌活性<sup>[24]</sup>。rAgP 安全性好, 可避免广谱抗菌活性可能造成的副作用, 在未来的临床应用中有可能发展成为一种新型特异治疗 *S. aureus* 感染的抗菌药物。

## 2.4 毒理学研究

抗菌肽在高效杀菌的同时也可能作用于高等有机体, 包括人体细胞, 细胞毒性是抗菌肽应用中的一个限制因素。Plectasin 及其类似物具有良好的安全性, 不会对鼠的 L929 成纤维细胞、人的表皮角蛋白细胞、红细胞、支气管细胞以及肺细胞产生毒性<sup>[28-29]</sup>, 也不会诱导白细胞介素 8 (IL-8) 在细胞中的转录<sup>[7]</sup>。rAgP 在浓度为 512 μg/mL 时, 仅引起人类 1% 血细胞的溶血。这些数据均证实了 plectasin 无明显的细胞毒性。由于 plectasin 及其类似物在抗菌上表现出巨大的优势, 因而在 *S. aureus* 和 *S. pneumoniae* 感染的临床治疗中, plectasin 可能是一个潜在的替代传统抗生素的候选药物。

## 3 Plectasin作用机制

Plectasin 对细胞壁生物合成过程起作用, 靶向作用于细菌细胞壁 Lipid II 的前体。枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 生长动力学表明, plectasin 的动力学行为与细胞壁干扰因子 (万古霉素、青霉素、杆菌肽等) 相似, 与快速溶解细胞膜的因子 (多黏菌素、novispirin 等) 不同, 这提示 plectasin 通过干扰细胞壁的生物合成起作用<sup>[7]</sup>。Plectasin 对大分子生物合成途径影响机制的研究显示, plectasin 并不抑制蛋白质的合成以及氨基酸的形成过程, 而是抑制葡糖胺细菌肽聚糖的前体物质参与的细胞壁形成。之后的胞壁体外合成实验表明, plectasin 不抑制细胞壁合成相关酶系的活性, 而是与 Lipid II 以 1:1 的化学计量结合。NMR 测定的三维结构分析显示, F2、G3、C4 和 C37 这 4 个残基参与了 Lipid II 中的焦磷酸盐形成氢键<sup>[7]</sup>。Plectasin 的作用机制明晰, 为其临床应用提供了必要的理论基础。

## 4 Plectasin代谢动力学研究

正确理解和应用抗菌药代动力学 (pharmacokinetics, PK) 和药效学 (pharmacodynamics, PD) 原理,



设计最佳给药方案有利于临床抗菌药物清除病原菌, 获得最大疗效并将不良反应降至最低, 还可减少耐药菌的产生, 同时可提高患者的顺应性, 减轻患者的医疗负担。药物代谢动力学研究缺乏也是抗菌肽类药物临床应用中需解决的问题。

#### 4.1 NZ2114药代动力学的研究

NZ2114 和头孢曲松对耐青霉素的 *S. pneumoniae* 菌株的 MIC 分别为 0.25  $\mu\text{g/mL}$  和 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 。药代动力学分析结果显示, NZ2114 渗透完整血脑屏障的能力较弱, 仅为 1.1%<sup>[16]</sup>; 而在脑膜炎时, NZ2114 透过血脑屏障的能力大幅度提升至 33%, 远高于头孢曲松 (15%) 和万古霉素 (13%)。NZ2114 在脑脊液中浓度高于大多数革兰氏阳性病原体的最小抑菌浓度, 包括 *S. pneumoniae*<sup>[16,30]</sup>。NZ2114 在兔血清中的蛋白结合率为 91.6%~94.5%, 这与 plectasin 在人和小鼠血清中的结合相一致。两个研究团队分别对兔、鼠单剂量给予 NZ2114 后的药代动力学进行分析, 主要包括不同剂量半衰期 ( $T_{1/2}$ )、血药峰浓度 ( $C_{\text{max}}$ ) 及血药浓度时间曲线下面积 ( $\text{AUC}_{0-t}$ ), 结果显示鼠中 NZ2114 的半衰期要明显大于兔, 如 10 mg/kg 剂量下鼠的  $T_{1/2}$  为 63 h, 而兔仅为 2.67 h (表 1)<sup>[22,31]</sup>。NZ2114 在鼠皮下单剂量给药血清中的蛋白结合率约为 80%。同时, NZ2114 具有较长时间的抗生素后效应, 可能会提供优势给药策略。可见, NZ2114 有望成为治疗中枢神经系统感染的新候选药物, 包括治疗耐青霉素的肺炎球菌性脑膜炎。

#### 4.2 抗药抗体(antidrug antibodies, ADAs)对plectasin药代动力学的影响

部分抗体能通过改变药物的药代动力学来影响一些相应的生物效应和毒性<sup>[32-33]</sup>。与常规抗生素比较, plectasin 是一种生物大分子, 具有导致机体产生抗药抗体的可能。小鼠经皮下单次注射 plectasin 后, 5 d 内未产生 ADAs, 30 d 后全部动物产生明显的 ADAs。体外活性研究表明, 单独免疫 plectasin 后, 小鼠血清对 plectasin 的抗菌活性未产生明显影响 ( $P>0.05$ ), plectasin 与弗氏不完全佐剂共同免疫小鼠后的血清 (含高浓度的抗 plectasin 抗体) 也仅在

plectasin 浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  时显著影响其活性<sup>[33]</sup>。进一步在腹膜炎动物模型中的研究显示, 皮下注射 plectasin 对已产生 ADAs 的腹膜炎小鼠仍具有良好的疗效, 与不具有 ADAs 的小鼠之间无显著性差异 ( $P>0.05$ )。药物代谢动力学研究显示, ADAs 值较高的小鼠 plectasin 平均半衰期为 51 min, 而 ADAs 值较低的小鼠平均半衰期为 38 min, 与不含有 ADAs 的动物 (42~47 min) 无显著性差异 ( $P>0.05$ )<sup>[33]</sup>。可见, 机体虽可产生抗 plectasin 的抗体, 但 ADAs 不影响 plectasin 的治疗效果及药代动力学特征<sup>[33]</sup>。同时, plectasin 也不会导致荨麻疹、红斑、瘙痒等过敏反应<sup>[34]</sup>。

### 5 Plectasin的高效表达

能否生产出高产量、高活性和高纯度的产物是蛋白多肽类药物在商业上发展的限制因素。2003 年, Schnorr 等<sup>[35]</sup> 在米曲霉中表达 plectasin, 其表达量约为 50 mg/L。2010 年, Jing 等<sup>[36]</sup> 在 *E. coli* 表达系统中, 优化 plectasin 编码序列并克隆到载体 pET32a(+) 上, 在 *E. coli* 中作为硫氧还蛋白 (Trx) 融合蛋白表达, 每升细胞培养液中融合蛋白产率约为 92 mg, 从 92 mg 融合蛋白获得 3.5 mg 重组 plectasin 多肽。2011 年, Zhang 等<sup>[18]</sup> 应用密码子优化基因编码 plectasin, 合成并克隆到 pPICZaA 表达载体上, 在毕赤酵母 X-33 (*P. pastoris* X-33) 株中表达。经过 120 h 诱导重组酵母, 总分泌蛋白量达 748.63 mg/L, plectasin 在 *P. pastoris* 中的产量占总分泌蛋白的 71.79%, 达 537 mg/L 左右。在毕赤酵母与大肠杆菌中的高效表达为 plectasin 活性优化、结构改造提供了理论依据, 为其在治疗感染性疾病应用方面奠定了基础, 同时为 plectasin 的大规模制备提供了参考依据。

### 6 结语

*S. pneumoniae*、*S. aureus* 具有严重危害, 且耐药较为严重, 近年来发现的 plectasin 及其改造产物对 *S. pneumoniae*、*S. aureus* 具有显著的活性。Plectasin 是一种对革兰氏阳性细菌具有高效杀菌效力的真菌防御素, 其抗菌机制明晰, 且 plectasin 及 plectasin 类似物 NZ2114 药代动力学获得了广泛的研究; 此外, 对 plectasin 的体外高效表达研究也较为深入。这些研究对 plectasin 的应用进行了全面的探索, 克服了肽类药物开发中的障碍, 为 plectasin 的临床应用奠定了坚实的基础。目前 Novozyme 公司与 Sanofi-Aventis 公司已经进行合作, 对 NZ2114

表1 NZ2114兔和鼠皮下单剂量给药血清药物动力学<sup>[22,31]</sup>

	兔NZ2114 (mg/kg)		鼠NZ2114 (mg/kg)			
	5	10	20	10	40	160
$T_{1/2}$ (h)	2.13	2.67	2.00	21	63	126
Free $C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	1.78	3.30	8.44	0.38	0.62	1
Free $\text{AUC}_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ )	3.09	4.26	10.30	17	79	204

应用于治疗严重的革兰氏阳性菌感染进行研究, 它有望成为新型抗感染药物。

### [参 考 文 献]

- [1] Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br Anaesthesia*, 2004, 92(1): 121-30
- [2] Menichetti F. Current and emerging serious Gram-positive infections. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11 (Suppl 3): 22-28
- [3] Young LS, Perdreau-Remington F, Winston LG. Clinical, epidemiologic, and molecular evaluation of a clonal outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2004, 38(8): 1075-83
- [4] Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(9): 727-38
- [5] Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 2005, 437(7061): 975-80
- [6] Hara S, Mukae H, Sakamoto N, et al. Plectasin has antibacterial activity and no affect on cell viability or IL-8 production. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(4): 709-13
- [7] Schneider T, Kruse T, Wimmer R, et al. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science*, 2010, 328(5982): 1168-72
- [8] Froy O, Gurevitz M. Arthropod defensins illuminate the divergence of scorpion neurotoxins. *J Pept Sci*, 2004, 10(12): 714-8
- [9] Mandal K, Pentelute BL, Tereshko V, et al. Racemic crystallography of synthetic protein enantiomers used to determine the X-ray structure of plectasin by direct methods. *Protein Sci*, 2009, 18(6): 1146-54
- [10] Matthews BW. Racemic crystallography--easy crystals and easy structures: what's not to like? *Protein Sci*, 2009, 18(6): 1135-8
- [11] Yang YS, Mitta G, Chavanieu A, et al. Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1). *Biochemistry*, 2000, 39(47): 14436-47
- [12] Zhu S. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS $\alpha$  $\beta$  defensins. *Mol Immunol*, 2008, 45(3): 828-38
- [13] Eckert R. Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Future Microbiol*, 2011, 6(6): 635-51
- [14] Boman HG. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev*, 2000, 173(1): 5-16
- [15] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-95
- [16] Ostergaard C, Sandvang D, Frimodt-Moller N, et al. High cerebrospinal fluid (CSF) penetration and potent bactericidal activity in CSF of NZ2114, a novel plectasin variant, during experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(4): 1581-5
- [17] Gottlieb CT, Thomsen LE, Ingmer H, et al. Antimicrobial peptides effectively kill a broad spectrum of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* strains independently of origin, sub-type, or virulence factor expression. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 205
- [18] 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*. *Protein Expr Purif*, 2011, 78(2): 189-96.
- [19] Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci*, 2005, 6(1): 35-51
- [20] Torres MK, Draghi DC, Pillar CM, et al. Activity of NZ2114 against *staphylococcal* and *streptococcal* isolates, including resistant phenotypes [C]. Poster Session in Forty-eighth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008
- [21] Brinch KS, Sandberg A, Baudoux P, et al. Plectasin shows intracellular activity against *Staphylococcus aureus* in human THP-1 monocytes and in a mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(11): 4801-8
- [22] Xiong YQ, Hady WA, Deslandes A, et al. Efficacy of NZ2114, a novel plectasin-derived cationic antimicrobial peptide antibiotic, in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(11): 5325-30
- [23] 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*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(2): 681-94
- [24] Mao R., Teng D, Wang X, et al. Design, expression, and characterization of a novel targeted plectasin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(9): 3991-4002
- [25] Qiu XQ, Zhang J, Wang H, et al. A novel engineered peptide, a narrow-spectrum antibiotic, is effective against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(3): 1184-9
- [26] Qiu XQ, Wang H, Lu XF, et al. An engineered multi-domain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(12): 1480-5
- [27] Franzman MR, Burnell KK, Dehkordi-Vakil FH, et al. Targeted antimicrobial activity of a specific IgG-SMAP28 conjugate against *Porphyromonas gingivalis* in a mixed culture. *Int J Antimicrobial Agents*, 2009, 33(1): 14-20
- [28] Wang Y, Jiang Y, Gong T, et al. High-level expression and novel antifungal activity of mouse beta defensin-1 mature peptide in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(1): 213-21
- [29] Brinch KS, Tulkens PM, Van Bambeke F, et al. Intracellular activity of the peptide antibiotic NZ2114: studies with *Staphylococcus aureus* and human THP-1 monocytes, and comparison with daptomycin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(8): 1720-4
- [30] Ostergaard C, Konradsen HB, Samuelsson S. Clinical presentation and prognostic factors of *Streptococcus pneumoniae* meningitis according to the focus of infection. *BMC*

- Infect Dis, 2005, 5: 93
- [31] Andes D, Craig W, Nielsen A, et al. *In vivo* pharmacodynamic characterization of a novel plectasin antibiotic, NZ2114, in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(7): 3003-9
- [32] Brinch KS, Frimodt-Moller N, Hoiby N, et al. Influence of antidrug antibodies on plectasin efficacy and pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(11): 4794-800
- [33] Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res*, 2005, 30(7): 505-15
- [34] Haller CA, Cosenza ME, Sullivan JT. Safety issues specific to clinical development of protein therapeutics. *Clin Pharmacol Therapeut* 2008, 84(5): 624-7
- [35] Schnorr KM, Hansen MT, Mygind PH, et al. Antimicrobial polypeptides from *Pseudoplectania nigrella*: US, 7972814 B2[P]. 2011-07-05
- [36] Jing XL, Luo XG, Tian WJ, et al. High-level expression of the antimicrobial peptide plectasin in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 2010, 61(3): 197-202