

## 新型青蒿素衍生物改善溶解度及其抗结核活性研究

张 宁<sup>1</sup>, 刘 洋<sup>2</sup>, 李 晔<sup>2\*</sup>, 胡 平<sup>1,2\*</sup>

(1. 重庆大学药学院, 重庆 401331; 2. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003)

**摘要:** 青蒿素及其衍生物已被证明具有抗结核菌活性, 但在水中的低溶解度影响了其药效及适用剂型的制备。本研究设计合成了一个新型的青蒿素衍生物, 通过琥珀酸将精氨酸链接到青蒿素分子上, 既解决了青蒿素溶解度低的问题, 又进一步利用精氨酸对细菌细胞壁的扰乱作用, 增强了细菌对精氨酸所携带青蒿素的摄取, 从而提高了青蒿素的抗菌效果。结果显示, 与青蒿素原型药物相比, 合成的青蒿素衍生物 **A-2** 和 **A-3** 在水中的溶解度提高了约 19.8~27.8 倍。体外细胞毒性证明, 质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的化合物 **A-3** 对人白血病单核巨噬细胞无明显细胞毒性。体外抗结核菌实验表明, 目标化合物 **A-2** 和 **A-3** 最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 20 和  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 相对青蒿素提高了 5~10 倍。细胞内抑菌实验表明, **A-3** 在较低浓度 ( $100$  和  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 下就可显著抑制 THP-1 巨噬细胞的胞内细菌生长 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其作用强于  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  青蒿素 ( $P < 0.05$ )。说明 **A-3** 是具有成药潜力的抗结核先导化合物。

**关键词:** 青蒿素; 衍生物; 结核病; 精氨酸; 溶解度

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2019)01-0036-05

## Enhancement of water solubility and anti-tuberculosis activities by a novel artemisinin derivative

ZHANG Ning<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>2</sup>, LI Ye<sup>2\*</sup>, HU Ping<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Chongqing University, Chongqing 401331, China;

2. Shanxi Chinese Medicine Research Institute, Xi'an 710003, China)

**Abstract:** Artemisinin and its derivatives have been proved for their anti-tuberculosis activities, despite its low water solubility which hampered its efficacy and corresponding formulation development. In this study we designed and synthesized a novel artemisinin analog by conjugating an arginine through a succinic acid linker. This design not only enhanced the water solubility of the artemisinin, but also increased the efficacy of the molecule towards tuberculosis bacteria due to disruption by arginine. The results showed that the solubility of the synthesized derivatives **A-2** and **A-3** increased 19.8-27.8 folds compared to artemisinin. *In vitro* cytotoxicity experiment showed that compound **A-3** had negligible toxicity to THP-1 cells up to  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the minimal inhibitory concentration (MIC) of **A-2** and **A-3** was 20 and  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively, which was 5 or 10 times lower than that of artemisinin. Intracellular bacteria inhibition experiment showed that compound **A-3** at lower concentrations such as 100 or  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  significantly inhibited the growth of tuberculosis bacteria ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), which efficacy was stronger than artemisinin at the concentration of  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . These results strongly suggested that compound **A-3** was a potential anti-tuberculosis lead compound.

**Key words:** artemisinin; derivative; tuberculosis; arginine; solubility

收稿日期: 2018-09-25; 修回日期: 2018-11-06.

基金项目: 陕西省中药创新药物研究中心项目 (2017YWZX-02).

\*通讯作者 Tel: 86-29-87251591, E-mail: liyelsj@163.com;

Tel: 18581483142, E-mail: inzahu@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0876

结核病 (tuberculosis) 是一类由结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 引起的对人类的生命与健康产生极大威胁的慢性传染病<sup>[1,2]</sup>。目前临床上常用的异烟肼、利福平和乙胺丁醇等抗结核药物使

用已超过半个世纪,但疗效均不显著,且需大剂量长期使用,不良反应大,易诱导结核杆菌的耐药性的产生<sup>[3,4]</sup>。迫切需要开发具有新的作用机制,并且能有效应对结核杆菌的新药。

近几年来,从天然药物中提取有效成分及单体作为抗结核药物的研究已经取得了一些进展<sup>[5,6]</sup>,青蒿素(artemisinin)就是其中代表。青蒿素是我国药学人员于20世纪70年代从菊科植物黄花蒿中提取的一种含过氧基团结构的倍半萜内酯化合物,主要衍生物包括青蒿琥酯(artesunate)、二氢青蒿素(dihydroartemisinin)、蒿甲醚(arthemether)和蒿乙醚(arteether)等,其针对临床各型疟疾的治疗效果显著<sup>[7,8]</sup>。近年来陆续有研究报道青蒿素类药物也具有抗菌、抗肿瘤、抗纤维化和抗病毒等多种药理作用<sup>[9-13]</sup>。因此,拓展青蒿素及其衍生物用途,开发其潜在的药用价值,具有重要意义。

尽管近来研究表明青蒿素及其衍生物对结核杆菌有一定活性,但其抗菌活性有待进一步提高<sup>[14,15]</sup>。青蒿素在水中低溶解度不可避免地影响其成药性及剂型的制备。有研究<sup>[16-18]</sup>表明,水溶性精氨酸分子中的胍基结构能有效扰乱细菌细胞壁,促进其连接的小分子穿透细菌细胞壁进入细菌。本研究拟将青蒿素通过琥珀酸连接1个精氨酸分子,形成一个新的水溶性更好的青蒿素衍生物。由于精氨酸分子中极性基团的加入,研究测定了合成的衍生物溶解度,并进一步测定了其体外抗结核分枝杆菌的活性。

## 材料与方 法

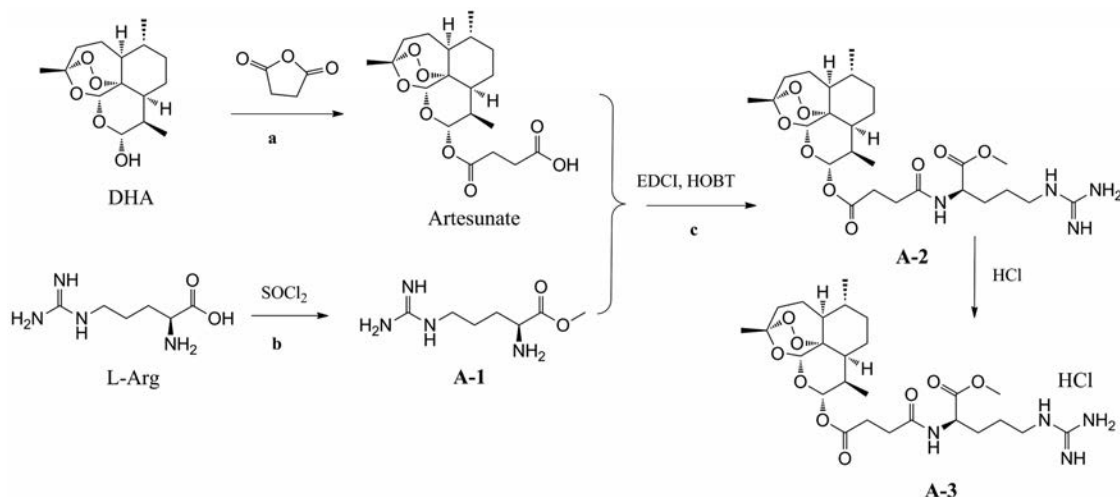
**材料** 结核分枝杆菌 H<sub>37</sub>Rv 购自北京生物制品研

究所;人白血病单核巨噬细胞 THP-1 购自中国科学院上海细胞库。菌株和细胞均由陕西省中医药研究院实验室培养传代保存。

**试剂和仪器** 实验中所有 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C 核磁共振图谱使用 Agilent 400 MHz DD2 及 Agilent 600 MHz DD2 型核磁共振波谱仪 (Agilent 公司) 测定;四甲基硅烷 (TMS) 为内标 (Aldrich 公司)。除非特别声明,所有涉及的反应都在氮气保护的条件下操作,CDCl<sub>3</sub>、methanol-*d*<sub>4</sub> 和 C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>O<sub>8</sub> 等溶剂和试剂均为市售分析纯,购于安耐吉试剂公司。

**目标化合物的合成** 按照合成路线图 1,以二氢青蒿素 (DHA) 为原料,根据文献<sup>[19]</sup>报道,首先合成青蒿琥酯。同时,以 *L*-精氨酸 (*L*-Arg) 为原料制备合成 *L*-精氨酸甲酯 (A-1)<sup>[20]</sup>。然后通过缩合反应,以青蒿琥酯和 *L*-精氨酸甲酯为原料,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI)、1-羟基苯并三唑 (HOBT) 为缩合试剂,在 DMF 中常温搅拌 2~3 h,获得目标化合物 A-2。将 A-2 溶于氯仿溶液中,搅拌下通入干燥氯化氢气体至 pH 4,浓缩旋出氯仿,再通过冷却结晶可获得目标物盐酸盐 A-3。化合物经 HPLC 测定含量,经核磁共振波谱仪确认化学结构。

**目标化合物的溶解度测试** 取过量待测化合物 (约 500 mg) 和对照药物加入 2 mL 不同的溶液 (纯水、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、pH 7.0 磷酸盐缓冲液及 pH 9.0 硼酸盐缓冲液),于 5 mL 具塞锥形瓶中,将锥形瓶放置到含磁力搅拌的恒湿水浴槽中,控制温度 25 °C,一式三份,搅拌 24 h。静置后取样品离心 (10 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min),取上清液,采用紫外分光光度仪于 220 nm 处测定吸光度值,与标准品对比后计算溶解度。



**Scheme 1** Synthesis routes of target compounds. Reagents and conditions: a: Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 1 h; b: SOCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH, overnight; c: EDCI, HOBT, DMF, RT, 2-3 h

**体外抗结核分枝杆菌活性** 采用美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 推荐的平皿二倍稀释法测定目标化合物及对照药的最低抑菌浓度 (MIC), 阳性对照药为异烟肼。于无菌平皿内加入药液 1 mL, 再加入融化的 50 °C MH 培养基 14 mL, 混匀, 使每皿内含药物终质量浓度依次为 2、1、0.5、0.2、0.1、0.05、0.02 和 0.01 mg·mL<sup>-1</sup>; 待冷却后用 Denlay 多点接种仪接种细菌, 接种菌量约为每毫升 1×10<sup>5</sup> 菌落形成单位 (CFU)。置于 35~37 °C 培养箱内培养 24 h, 观察并记录结果, 无菌生长的平皿中所含药物最小浓度即 MIC。

**MTT 法测定目标化合物对细胞 THP-1 的毒性** 将 THP-1 细胞接种于 96 孔板, 每孔 4×10<sup>4</sup> 个细胞。向孔内加入 RPMI-1640 培养液 (含 10% 胎牛血清) 100 μL, 其中分别含有药物质量浓度为 0、50、100、200、400、600、800 和 1 000 μg·mL<sup>-1</sup>, 设为实验组; 不含药物的 RPMI-1640 培养液作为空白对照。于第 4 天向 96 孔细胞培养板上每孔加入 5 mg·mL<sup>-1</sup> MTT 10 μL, 继续培养 4 h 后, 取出细胞培养板, 离心弃上清液, 每孔加 DMSO 100 μL, 混匀后室温放置 20 min, 于 570 nm 测定吸光值 (A), 按下述公式计算巨噬细胞存活率 (CL)。

$$CL(\%) = (A_{\text{感染}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{未感染}} - A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

**化合物对巨噬细胞胞内 H<sub>37</sub>Rv 株抑制作用检测** 细菌与巨噬细胞的比例为 10:1 (H<sub>37</sub>Rv 1×10<sup>7</sup>/mL, THP-1 细胞数 1×10<sup>6</sup>/mL) 混合, 在终浓度为 100 mmol·L<sup>-1</sup> 丙二醇甲醚醋酸酯 (PMA) 中诱导细胞分化。96 孔板每孔加菌悬液 100 μL, 感染 4 h 后, 每孔加含不同浓度目标化合物 100 μL 继续培养, 给药质量浓度为 0、100、200、400、600、800 和 1 000 μg·mL<sup>-1</sup>, 用 RPMI-1640 完全培养液作空白对照, 100 μg·mL<sup>-1</sup> 青蒿素和 100 μg·mL<sup>-1</sup> 异烟肼作为阳性对照。以加细菌悬液时作为细菌感染零时, 分别于感染后 0、4 及 7 天去除板上培养液, 每孔加入 1% Triton X-100 裂解细胞 50 μL。待其全部裂解后, 每孔加 RPMI-1640 细胞培养液 50 μL, 终止裂解。混匀后每孔分别以 1:10 和 1:100 稀释, 接种于正常培养基 37 °C 培养 14 天后计算 CFU。

**统计学处理** 各组数据结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验进行各组间均数比较, *P*<0.05 为差异显著, *P*<0.01 为差异极显著。

## 结果

### 1 中间体青蒿琥酯的合成

二氢青蒿素 (5.28 mmol, 1 500 mg) 溶于 75 mL 干燥的二氯甲烷中, 室温下搅拌。将琥珀酸 (6.33 mmol, 630 mg) 和三乙胺 (26.4 mmol, 3.7 mL) 分别滴加到上

述混合液中, 室温反应 1 h。反应加饱和柠檬酸 (pH 2, 2×20 mL) 洗涤两次, 加无水硫酸镁干燥。柱层析分离纯化, 获得目标化合物无色固体青蒿琥酯 (2 027 mg, 收率 65%); 纯度 99%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.53 (d, 1H, *J*=9.9 Hz), 4.76 (s, 1H), 2.42 (m, 2H), 2.34 (m, 4H), 2.20 (m, 1H), 1.88~1.08 (m, 10H), 1.36 (m, 3H), 0.89~0.78 (m, 6H)。

### 2 中间体化合物 A-1 的合成

二氯亚砷 (18.8 mmol, 3 280 mg) 溶于 10 mL 甲醇中, 反应液降温至 -10 °C, 然后加入精氨酸 (11.5 mmol, 2 000 mg)。室温反应过夜, 减压旋出溶剂并加入乙醚 20 mL, 降温至 -20 °C 重结晶获得无色固体目标物 A-1 (2 160 mg, 收率 98%); 纯度 99%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.68 (s, 3H), 3.15 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.64 (m, 2H)。

### 3 目标化合物 A-2 及 A-3 的合成

青蒿琥酯 (1 mmol, 384 mg) 和 *L*-精氨酸甲酯 A-1 (1 mmol, 188 mg) 溶于 5 mL DMF 中, 常温下搅拌, 然后向该混合液中加入 EDCI (1 mmol, 191 mg) 和 HOBT (0.2 mmol, 27 mg)。常温下继续反应 2~3 h。检测反应完毕, 旋出 DMF 然后加乙酸乙酯萃取, 饱和碳酸氢钠溶液洗涤 3 次, 加无水硫酸镁干燥, 柱层析分离纯化得到目标物 A-2。得淡黄色油状物 204 mg, 收率 37%; 纯度 99%。进一步通过氯化氢气体成盐后结晶得到化合物 A-3。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 5.45 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 4.11 (1H), 3.83 (s, 3H), 3.37 (1H), 3.28~3.26 (m, 2H), 2.35~1.50 (m, 18H), 1.34 (m, 3H), 0.94~0.84 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.8, 169.3, 157.2, 104.0, 103.1, 87.7, 80.8, 55.0, 52.8, 52.5, 44.5, 40.6, 40.5, 37.2, 36.1, 34.4, 30.9, 28.6, 28.5, 27.3, 24.9, 24.5, 24.4, 24.2, 19.6, 12.1。

### 4 目标化合物的溶解度测试

合成的目标化合物在水和不同 pH 值的缓冲液中的溶解度见表 1。与青蒿素相比, A-2 在水中的溶解度达到 2.34 mg·mL<sup>-1</sup>, 是青蒿素的 19.8 倍; 同时目标化合物的盐酸盐 A-3 在水中的溶解度进一步增加, 可达到青蒿素的 27.8 倍。在不同 pH 值的缓冲溶液中, A-2 和 A-3 在 pH 4.0 缓冲液中的溶解度比 pH 7.0 及 pH 9.0 缓冲液中略有增加。

### 5 体外抗结核分枝杆菌活性

合成的化合物对 H<sub>37</sub>Rv 菌株的抑菌活性见表 2。并以青蒿素、精氨酸和异烟肼为对照。结果表明, 青蒿素对于结核分枝杆菌 MIC 为 100 μg·mL<sup>-1</sup>, 目标化合物 A-2 和 A-3 MIC 分别为 20 和 10 μg·mL<sup>-1</sup>, 相对青蒿素

**Table 1** Solubility of the synthesized compounds

Compound	Solubility/mg·mL <sup>-1</sup>			
	Water	pH 4.0 Acetate buffer	pH 7.0 Phosphate buffer	pH 9.0 Borate buffer
Artemisinin	0.118 ± 0.005	0.113 ± 0.006	0.109 ± 0.004	0.104 ± 0.003
Compound A-2	2.34 ± 0.093	2.76 ± 0.108	2.29 ± 0.086	2.01 ± 0.067
Compound A-3	3.28 ± 0.084	3.70 ± 0.072	3.19 ± 0.105	2.63 ± 0.058

**Table 2** *In vitro* anti-tuberculosis test for synthesized compounds.

MIC: Minimal inhibitory concentration

Compound	MIC/μg·mL <sup>-1</sup>
Artemisinin	100
Compound A-2	20
Compound A-3	10
Arginine	>2 000
Isoniazid	1

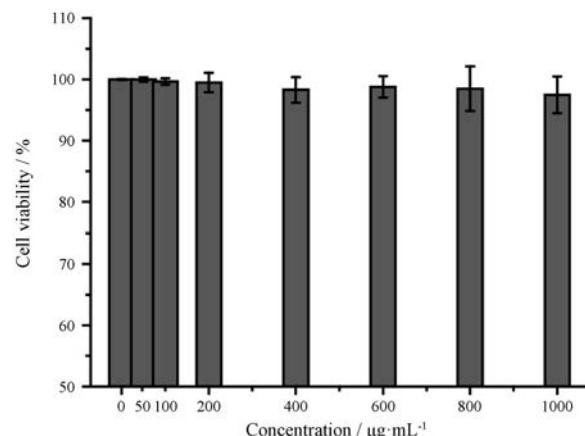
提高了5~10倍。与合成的化合物A-2及A-3相比,精氨酸未表现出明显抗菌活性,阳性对照药物异烟肼则显示了更强的抗菌活性。由于化合物A-3在实验中显示比A-2更强的活性,以下实验采用A-3进行。

## 6 MTT法测定目标化合物A-3对THP-1细胞的毒性

化合物A-3对THP-1巨噬细胞的体外毒性检测结果见图1。当给予A-3 100 μg·mL<sup>-1</sup>后,随着给药剂量增加至1 000 μg·mL<sup>-1</sup>,细胞存活率无明显降低。

## 7 化合物A-3对THP-1巨噬细胞的胞内H<sub>37</sub>Rv菌株抑制作用

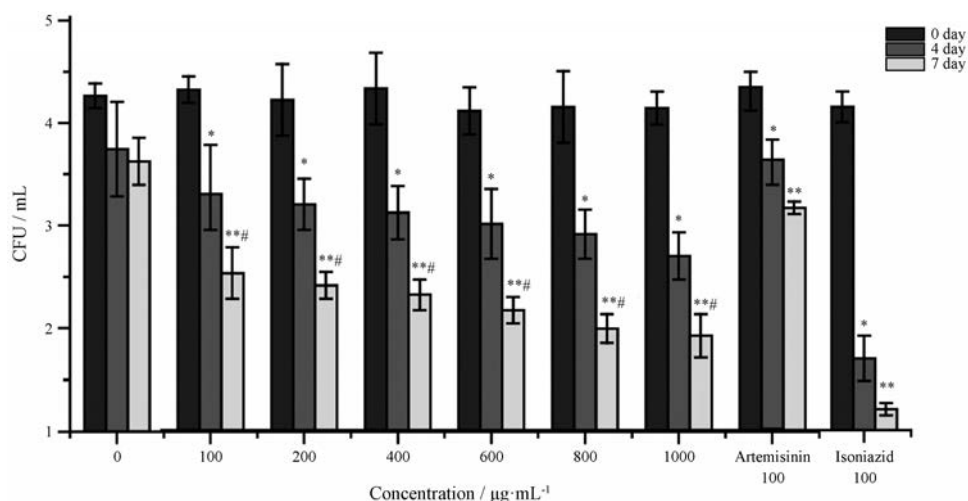
化合物A-3对感染了H<sub>37</sub>Rv细菌的THP-1巨噬细胞的胞内细菌的抑制作用见图2。在第4天和第7天时,与空白对照相比,A-3在100~1 000 μg·mL<sup>-1</sup>浓度内,甚至在较低浓度(100和200 μg·mL<sup>-1</sup>)下可显著抑制胞内细菌的生长( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),其作用强于100 μg·mL<sup>-1</sup>青蒿素,但不如阳性对照药物异烟肼。

**Figure 1** Cytotoxicity test of different concentrations of A-3 on THP-1 cells ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

## 讨论

目前临床上常用的抗结核药物如异烟肼、利福平等的使用已经超过半个世纪,新的抗结核药物非常稀缺,迫切需要开发具有新的作用机制,并有效抑制或杀灭结核菌的新药。

本研究利用青蒿素本身具有的过氧化桥环结构,在细菌内部可释放出活性氧簇ROS发挥其抗结核杆菌活性,进一步通过共价键引入具有穿透细菌细胞壁功能的精氨酸残基,并对其溶解度及体外抗结核杆菌和抗胞内结核杆菌感染的效果进行考察。结果显示所

**Figure 2** *In vitro* inhibition of the intracellular bacteria growth of A-3 on THP-1 cells ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ ). CFU: Colony-forming units. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs blank group; # $P<0.05$  vs artemisinin

合成的化合物不仅显著提高了青蒿素的溶解度,而且提高了对结核杆菌和胞内感染结核杆菌的抑制活性。

在合成步骤中,通过使用双功能性的琥珀酸作为连接桥,将精氨酸和青蒿素通过共价键连接起来。精氨酸不仅增加分子的溶解度,而且可以破坏细菌细胞壁,从而增加细菌对青蒿素分子的摄取。

溶解度实验结果表明,合成的化合物 **A-2** 及 **A-3** 在水中的溶解度可达约  $2\sim 3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,并在酸性缓冲盐溶液中进一步提高。这可能是在青蒿素的结构上引入了多个羰基及呈弱碱性的胍基,显著增强了目标化合物的极性。说明在酸性溶液或引入酸根有利于增加其在水中的溶解度。

体外抑菌实验表明,合成的化合物 MIC 可达到  $10\sim 20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,明显低于青蒿素的 MIC,虽不及阳性对照药物异烟肼,仍展现了较好的抗菌活性。人单核白血病巨噬细胞中的细胞毒性实验表明合成的化合物对于细胞本身的毒性很小。在胞内感染模型实验中,化合物 **A-3** 显示出比青蒿素更优异的抑制胞内细菌繁殖的作用,是具有成药潜力的抗结核先导化合物。值得一提的是,本研究尚未进行合成的化合物对耐药性结核杆菌的药效实验,目前这部分实验正在筹划中,还需要进一步研究探讨。

## References

- [1] Wei FH, Xu LH. Role of autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Chin J Veter Med (中国兽医杂志), 2018, 54: 65-68.
- [2] Coll F, Phelan J, Hill-Cawthorne GA, et al. Genome-wide analysis of multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Nat Genet, 2018, 50: 307-316.
- [3] Geng YH, Li ZQ. Research progress of the anti-tuberculosis drugs [J]. China Pharm (中国药业), 2016, 25: 10-17.
- [4] Zhuo WJ, Liu ZH, Qian M, et al. Analysis of rpoB mutation in rifampicin resistant tubercle bacillus with different resistance phenotype to first line antituberculosis drugs [J]. Mod Hosp (现代医院), 2014, 14: 4-6.
- [5] Chaudhary S, Sharma V, Jaiswal PK, et al. Stable tricyclic antitubercular ozonides derived from artemisinin [J]. Org Lett, 2015, 17: 4948-4951.
- [6] Choi WH. Novel pharmacological activity of artesunate and artemisinin: their potential as anti-tubercular agents [J]. J Clin Med, 2017, 6: 30.
- [7] Yang GX, Zheng X, Sun GX, et al. Research progress on artemisinin and its derivatives [J]. World Latest Med Inf (世界最新医学信息文摘), 2013, 13: 26-28.
- [8] Guo ZR. Development of artemisinin antimalarial drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 157-164.
- [9] Wang ZJ, Li YR, Wu WC, et al. Advances in pharmacological studies of artemisinin and its derivatives [J]. Guangxi Med J (广西医学), 2018, 40: 1222-1224.
- [10] Li B, Zhou H. Advances on the study of the pharmacological effects of artemisinin and its derivatives [J]. Chin J Clin Pharm Therapeut (中国临床药理学与治疗学), 2010, 15: 572-576.
- [11] Wang J, Zheng CY, Liu L, et al. Progress in synthesis and anti-cancer activities of artemisinin derivatives [J]. World Notes Antibiot (国外医药-抗生素分册), 2018, 39: 68-73.
- [12] Li T, Chen H, Liu XG, et al. Immunoregulatory effect of artesunate on allergic contact dermatitis and its mechanism [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 884-889.
- [13] Wang CM, Chen J, Jiang M, et al. Relationship between artesunate influence on the process of TGF- $\beta$ 1 induced alveolar epithelial cells transform intomesenchymal cells and on idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 142-147.
- [14] Zhan NY, Nie G, Huang HQ, et al. Preliminary study of artesunate and dihydroartemisinin reversing the susceptibility of RFP or INH resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Sun Yat-sen Univ (中山大学学报), 2009, 30: 8-11.
- [15] Bai J, Sun HF, Chen XF. Studies on the anti-*mycobacterium tuberculosis* activity of 4 Chinese medicinal herbs [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2007, 18: 77-78.
- [16] Ma QQ, Shan AS, Dong N, et al. De novo design of a Leu-Arg-rich antimicrobial peptide [J]. Acta Vet Zootech Sin (畜牧兽医学报), 2011, 42: 804-807.
- [17] Zhao WC, Han LL, Peng YJ, et al. Effect of basic amino acids on the biological activity of helical antimicrobial peptide [J]. Chem J Chin Univ (高等学校化学学报), 2018, 439: 681-687.
- [18] He DX, Chen L, Zhao JW, et al. Research trends of aminoglycosides-aminoglycoside derivatives containing guanidyl groups [J]. World Notes Antibiot (国外医药-抗生素分册), 2006, 27: 79-83.
- [19] Zhou FW, Lei HS, Fan L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of dihydroartemisinin-fluoroquinolone conjugates as a novel type of potential antitubercular agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24: 1912-1917.
- [20] Bardts M, Ritter H. Novel copolymers showing interactions of amidinium-carboxylate groups in water [J]. J Polym Res, 2011, 18: 151-155.