

## TOXIC MECHANISM OF Ro09-0198 ISOLATED FROM STREPTOVERTICILLIUM

Se-Young Choung

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Hoegi-Dong 1, Dongdaemun-Ku, Seoul, Korea

(Received June 20, 1990)

(Accepted June 30, 1990)

### Ro 09-0198의 독성발현 기전에 관한 연구

정 세 영

경희대학교 약학대학

**ABSTRACT:** Ro09-0198, a cyclic peptide isolated from culture filtrates of *Streptovercillium griseovercillatum*, induced lysis of erythrocytes. Ro-09-0198-induced hemolysis was temperature-dependent and the sensitivity of hemolysis differed greatly among animal species. Preincubation of the peptide with phosphatidylethanolamine reduced the hemolytic activity, whereas other phospholipids present in erythrocytes in nature had no effect. A study of the structural requirements on phosphatidylethanolamine necessary for interaction with the peptide indicates that Ro09-0198 recognizes strictly a particular chemical structure of phosphatidylethanolamine: dialkylphosphoethanolamine as well as 1-acylglycerophosphoethanolamine showed the same inhibitory effect on hemolysis induced by Ro09-0198 as diacylphosphatidylethanolamine, whereas phosphoethanolamine gave no inhibitory effect. Neither phosphatidyl-N-monomethylethanolamine nor alkylphosphopropanolamine had an inhibitory effect. Proton resonances of the peptide were observed in dimethyl sulfoxide solution in the presence of 1-dodecanoyl-sn-glycerophosphoethanolamine. This peptide caused permeability increase and aggregation of liposomes containing phosphatidylethanolamine. A glycerol backbone and a primary amino group of phosphatidylethanolamine are necessary for interaction with Ro09-0198 to cause membrane damage. Ro09-0198 induced a selective permeability change on liposomes. Glucose and umbelliferyl phosphate were effluxed significantly, but sucrose was only slightly permeable and inulin could not be released. Platelet aggregation and serotonin

release simultaneously induced by Ro09-0198. Addition of peptide to rat platelet, loaded with the fluorescent  $Ca^{++}$  chelator quin-2, caused immediate rise in cytosolic free  $Ca^{++}$  to liposomal membrane containing phosphatidylethanolamine was observed dose dependently.

**Keywords:** Ro09-0198, *Streptovorticillium griseovorticillatum*, hemolysis, phosphatidylethanolamine, platelet aggregation, serotonin, quin-2,  $Ca^{++}$  influx.

## 서 론

Ro 09-0198은 분자량 2041, 아미노산 15개로 이루어진 cyclic peptide이며 분자내에 lathionine,  $\beta$ -methyl lanthionine, lysinoalanine,  $\beta$ -hydroxy aspartic acid, D-phenylalanine과 같은 특이한 아미노산을 가지고 있다. Ro 09-0198은 *Streptovorticillium griseovorticillatum*의 culture filtrates에서 분리되었으며 항암작용과 항미생물작용이 있는 것이 밝혀졌다. 이러한 생리작용의 기전을 연구하는 과정에서 세포막의 인지질인 phosphatidylethanolamine이 그 receptor site가 되는 것이 밝혀졌으며 약물로서 개발하기 위한 독성연구과정에서 정맥내 대량투여에 의해 rat이 수분내에서 사망하는 것을 알 수 있었다. 이에 정맥내 투여시 제일 먼저 접하게 되는 적혈구와 혈소판을 중심으로 독성발현기전을 연구하게 되었다.

## 재료 및 방법

Rat, mouse, human, rabbit, cow, sheep의 적혈구를  $Na^{51}CrO_4$ 과 incubation하여 방사성 표식을 하고 일정시간 incubation한 후에 상등액 중의 방사선량을 측정함으로써 용혈 %를 측정했다.

Liposome은 phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamine(PE), dicetylphosphate(DCP), cholesterol 등을 reverse evaporation method에 의해 조제했다. Spin labelled PC(SL-PC)는 stearic acid(12'-(N-oxy-4", 4"-dimethylloxazolidine)-stearate)를 달걀로부터 추출한 lysoPC에 결합시켜 조제했다. Spin labelled PE는 SL-PC의 choline기를 phospholipase D에 의해 ethanolamine으로 치환시킨 것을 사용하였다. ESR은 JES-PE-1 X를 사용하였다. Lysophosphatidylethanolamine과 Ro 09-0198의 결합부위는 이차원 NMR을 이용하여 chemical shift 여부로 판별했다.

혈소판은 Rat, rabbit, human으로부터 채취하여 응집은 aggregometer로, degranulation은 미리  $C^{14}$ -serotonin으로 표지된 혈소판으로부터의 serotonin release를 봄으로써 측정했다. 혈소판으로의  $Ca^{2+}$  유입은 quin-2( $Ca^{2+}$ 과 결합하면 형광을 냄)를 미리 세포내에 넣어 놓고 Ro 09-0198을 가해 봄으로써 측정했다. Liposome으로부터의  $Ca^{2+}$  방출은  $^{45}Ca$ 를 reverse evaporation method에 의해 만든 liposome내에 봉입시켜 그 방출량을 측정했다.

## 결과 및 고찰

### 용혈작용 및 그 기전

Rat, mouse, human, cow, sheep의 적혈구 모두에 있어 용혈이 나타났으며 종에 따라 용혈이 일어나기

까지의 시간과 용혈이 끝날 때 까지 걸린 시간의 차가 크게 나타났다. 온도에 따라서도 용혈이 일어나는 시간의 차가 종에 관계없이 크게 나타났으며 그 감수성의 순서는 rat, mouse < human < cow, sheep 이었고 온도가 37°C에 가까울수록 용혈이 일어나기 까지의 시간이 짧았다.

사람의 적혈구에 대한 용혈작용의 시간과 용량에 따른 변화를 보았다.  $2 \times 10^7$  cells의 적혈구에 대해 5  $\mu$ M에서 100% 용혈이 일어났으며 이 때 걸린 시간은 15분이었다(Choung, *et al.*, 1988a).

이상의 결과로 Ro 09-0198은 가장 단순화된 세포모델인 적혈구의 막을 파괴하는 것이 예상되었으므로 그 기전을 알기위해 막성분인 인지질, 중성지질, 당지질, 단백질, 당분획에 대해 peptide와의 결합 여부를 살펴보았다. 일정시간 peptide와 위분획을 preincubation한 뒤  $^{51}\text{Cr}$ 로 표지된 적혈구를 가해 용혈이 억제된 정도를 봄으로써 막에 존재할지도 모를 receptor site를 추적하였다. 그 결과 인지질분획만이 용혈억제작용이 나타났으며 인지질 중 어느 것이 specific하게 결합하는가를 보기위해 적혈구 막에 흔히 존재하는 인지질인 PC, PE, cardiolipin(CL), phosphatidic acid(PA), phosphatidylinositol(PI), phosphatidylserine(PS)의 suspension 및 liposome을 만들어 peptide와 preincubation하였다.

그 결과 불포화지방산이 많은 Egg PE나 포화지방산이 많은 *E. coli* PE에서만 거의 비슷한 정도의 용혈억제가 있었으며 양자의 결합비도 0.45 nmole의 PE에 대해 약 0.43 nmole의 peptide가 소비된 것으로 보아 mole비로 약 1 : 1임을 알 수 있었다.

결합하는데 필요한 PE의 기본구조를 알아보기 위해 PE의 구조유사체를 합성하여 용혈억제실험을 실시하였다.

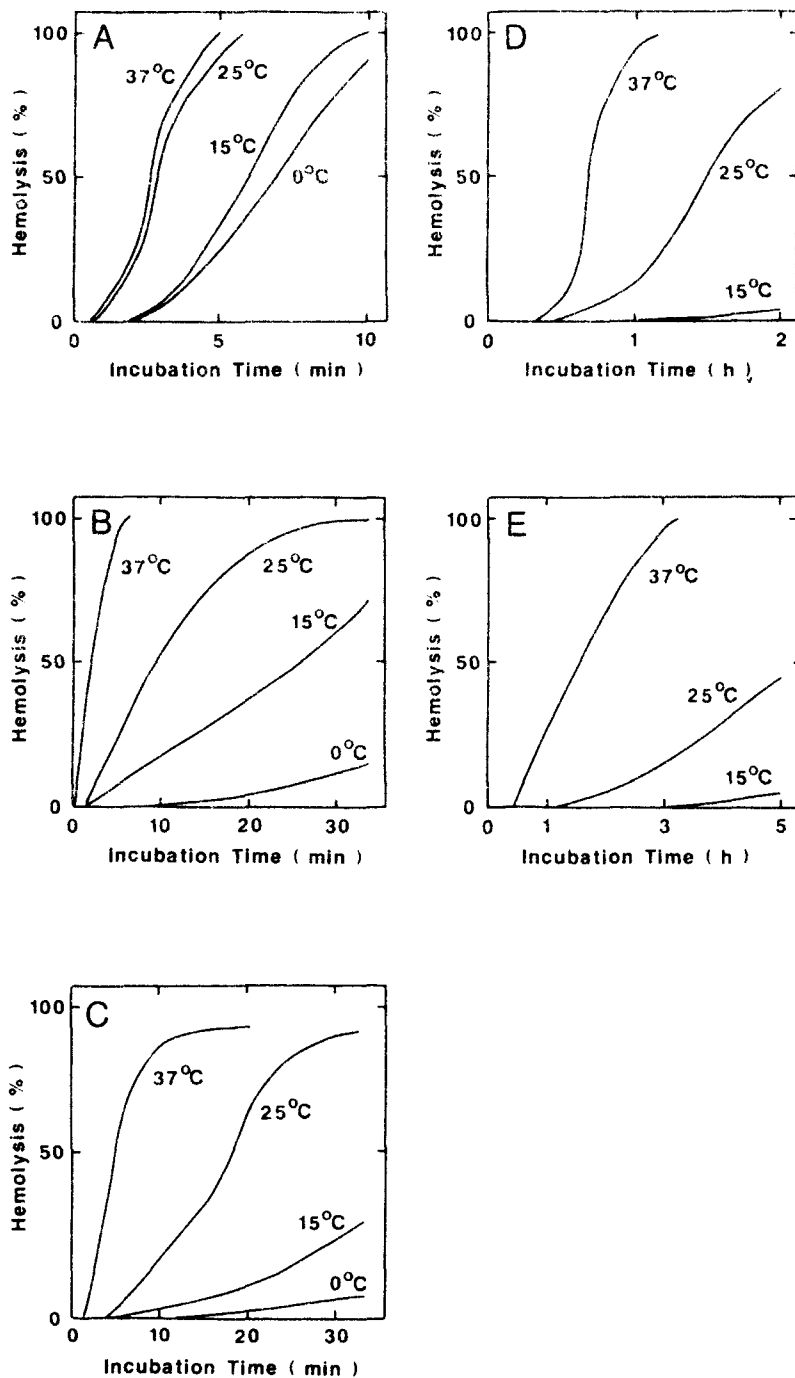
PE의 head group인 유리 amino기를 mono methyl, dimethyl amino기로 하면 용혈억제작용이 없어졌으며 인산기를 없앤 유사체, 인산기와 유리 amino기 사이를 탄소 2개에서 3개로 한 구조유사체에서 모두 용혈억제작용은 없었다.

또한 지방산을 하나만 가지고 있는 lyso체나 phosphoethanolamine의 인산기의 OH에  $\text{C}_{14}\text{H}_{28}$ 을 붙인 구조유사체에서 PE와 동일한 정도의 용혈작용이 나타났다. 이를 종합해 보면 인산기와 유리 amino기 그리고 이 양자 사이의 거리가 결합에 필수적이며 소수성기는 필수적이기는 하나 glycerol 골격을 반드시 가질 필요는 없다는 것을 알 수 있었다.

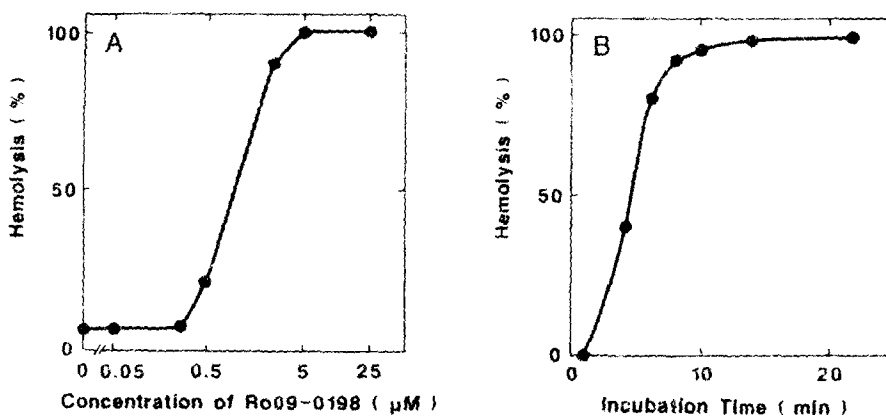
다음으로 peptide의 아미노산 잔기 중 어느 것이 결합에 관여하는 가를 보기위해 lysoPE에 peptide를 가하며 이차원 NMR의 chemical shift를 관찰하였다(Wakamatsu, *et al.*, 1990).

8번 위치의 aminobutyric acid(ABA), 13번 위치의 valine, 15번 위치의  $\beta$ -hydroxy aspartic acid에 있어 현저한 chemical shift가 일어났으며, 이를 PE 구조유사체와의 결합실험 결과와 종합해 보면 ABA, valine을 통한 소수성 결합(PE의 소수성잔기와),  $\beta$ -hydroxy aspartic acid와 유리 amino기와의 이온결합이 두 물질 사이의 결합에 관여하고 있을 가능성을 시사해주고 있다.

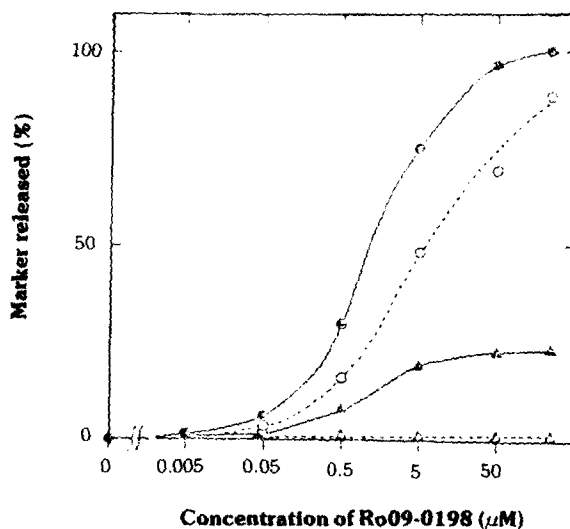
이상으로 막중의 PE가 peptide의 receptor site가 됨을 알 수 있었으며, 결합한 뒤의 PE-peptide의 동태와 막의 perturbation 과정을 보기위해 PE를 포함한 liposome에 molecular marker를 포함시키고 peptide를 가해 보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 분자량 243의 umbelliferyl phosphate(Ump)는 쉽게 release하였으나 분자량 342의 sucrose는 거의 release하지 않았고 분자량 5000의 inulin은 전혀 release가 안일어나 분자량 약 300 정도를 쉽게 통과시키는 pore를 형성할 가능성을 보여 주었다. 이 때 PE의 동태를 보기위해 12SL-PE와 12SL-PC를 함유한 liposome에 있어서의 peptide 유무에 따른 ESR signal 변화를 보았다. Fig. 4에 나타난 것처럼 37°C에 있어 12SL-PE의 signal은 실선으로 부터 점선과 같이 변화했다. 같은 조건하에서 12SL-PC의 ESR signal은 유의성있는 변화를 보여주지 못했다. 이 사실은 liposome 막상에서 PE가 cluster를 형성했을 가능성을 시사해주는 것이다. 즉 ESR signal 강도의 감소는 spin 화합물이 서로 접근하여 spin-spin 상호작용을 강하게 일으킨 결과인 것이다. 이를 토대로 Fig. 5과 같은 모형을 제시하였다.



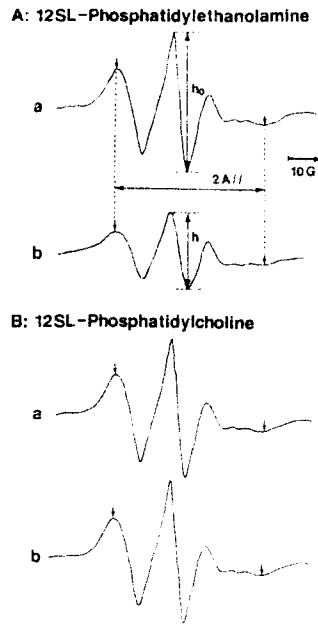
**Fig. 1.** Temperature dependence of Ro09-0198-induced hemolysis of erythrocytes from various animal species. Erythrocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) from rat (A), rabbit (B), man (C), cow (D) or sheep (E) were incubated with  $5 \mu\text{M}$  of Ro09-0198 at 0, 15, 25 or  $37^\circ\text{C}$ .



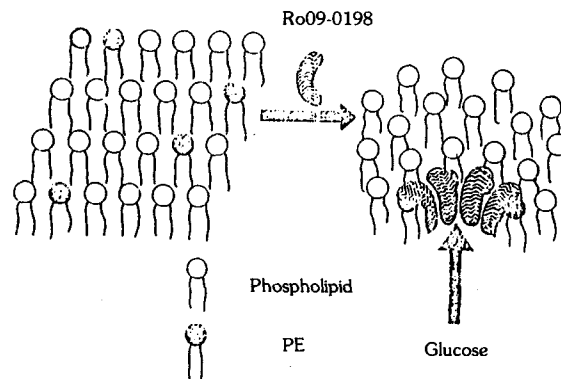
**Fig. 2.** Hemolysis of human erythrocytes by Ro09-0198. Dose-response (A). Human erythrocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were incubated with various concentrations of Ro09-0198 at 37°C for 30 min. Time-course (B). Erythrocytes ( $1 \times 10^7$  cell/ml) were incubated with 5 μM of Ro09-0198 at 37°C and the percentage of hemolysis was measured at various times.



**Fig. 3.** Release of markers from liposomes induced by Ro09-0198. Liposomes composed of egg-yolk phosphatidylcholine, egg-yolk phosphatidylethanolamine, dicetyl phosphate and cholesterol (molar ratio, 0.75:0.25:0.1:1.0) were swollen in 0.3 M glucose containing [ $^3\text{H}$ ]glucose (●), umbelliferyl phosphate (○), [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose (▲) or [ $^3\text{H}$ ]inulin (△), and untrapped markers were removed. The liposomes (10 μM as phospholipids) were incubated with various amounts of Ro09-0198 for 30 min at 37°C.



**Fig. 4.** ESR spectra of liposomes containing 12SL-phosphatidylethanolamine (A) or 12SL-phosphatidylcholine (B) in the presence or absence of Ro09-0198. (A) Liposomes were prepared from egg-yolk phosphatidylcholine, egg-yolk phosphatidylethanolamine, 12SL-phosphatidylethanolamine, dicetyl phosphate and cholesterol (molar ratio, 5:5:0.1::1:10). The liposomes (1 mM as phospholipids) were incubated without Ro09-0198 (a) or with 0.5 mM Ro09-0198 (b) at 37 °C for 30 min. (B) Liposomes were prepared from egg-yolk phosphatidylcholine, egg-yolk phosphatidylethanolamine, 12SL-phosphatidylcholine, dicetyl phosphate and cholesterol (molar ratio, 5:5:0.1:1:10). The liposomes (1 mM as phospholipids) were incubated without Ro09-0198 (a) or with 0.5 mM Ro09-0198 (b) at 37 °C for 30 min.



**Fig. 5.** Model figure of pore formation on liposomal membrane.

### 혈소판 활성화작용 및 그 기전

Rat의 혈소판을 분리한 뒤  $^{14}\text{C}$ -Serotonin과 incubation하여 함유시키고 peptide를 가하여 aggregometer를 이용한 응집여부와 상등액 중의 serotonin release를 보았다.

Peptide를 가한 뒤 5분의 lag time을 가지고 응집이 일어났으며 약간의 시차를 두고 serotonin의 release도 일어났다.

이와 같은 혈소판 활성화작용은 적혈구 용혈에서 처럼 rat, rabbit, human 모두에서 일어났으며 이는 세포막에 보편적으로 존재하는 PE를 receptor site로 한다는 점에서 당연하다 할 것이다.

응집과 Serotonin release는 human < rabbit < rat 순으로 일어났으며 다른 혈소판 활성화물질과도

**Table 1.** Inhibitory effects of various phospholipids on hemolysis induced by Ro09-0198

Phospholipids	Origin	50% hemolysis
Phosphatidylcholine	Egg yolk	>125
Phosphatidylethanolamine	Egg yolk	0.5
	<i>E. coli</i>	0.5
Cardiolipin	Bovine heart	>125
Phosphatidic acid	Egg yolk	>125
Phosphatidylinositol	Yeast	>125
Phosphatidylserine	Bovine brain	>125
Sphingomyelin	Bovine brain	>125

Ro09-0198 (0.86 nmol) preincubated with various amounts of phospholipid suspensions at 37°C for 30 min. Human erythrocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) labeled with  $^{51}\text{Cr}$  were added to the reaction mixture and incubated at 37°C for 30 min.

**Table 2.** Inhibitory effects of structural analogs of phosphatidylethanolamine on hemolysis induced by Ro09-0198

Structural analog	50% hemolysis
Diacylphosphatidylethanolamine	0.45
Dialkylphosphatidylethanolamine	0.45
1-Acylglycerophosphoethanolamine	0.44
Alkylphosphoethanolamine	0.54
Alkylphosphopropanolamine	> 25
Phosphatidyl-N-monomethylethanolamine	>125
Stearylamine	>125

Liposomes were prepared from a structural analog of phosphatidylethanolamine, egg-yolk phosphatidylcholine, dicetylphosphate and cholesterol (molar ratio, 0.25:0.75:0.1:1.0). Ro09-0198 (0.86 nmol) was preincubated with various amounts of these liposomes at 37°C for 30 min, and the hemolytic activities against human erythrocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) by the reaction mixtures were measured at 37°C for 30 min. Values are amounts (nmol) required for 50% inhibition of hemolysis.

**Table 3.** Chemical shifts (ppm) of Ro09-0198 in the absence (roman) and in the presence (italic) of C12-LPE and chemical shifts of LPE in the absence (roman) and in the presence (italic) of Ro09-0198 in  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}-d_6$  Solution at 45 °C

amino acid	N-H	C H	CmH	others
Ala(S) <sup>1</sup>	<i>a</i>	4.17	3.72, 3.06	
	<i>a</i>	4.19	3.70, 3.05	
Arg <sup>2</sup>	9.92	4.70	1.77, 1.47	1.64, 1.48 (C $\gamma$ H)
	<i>a</i>	4.72	1.74, 1.46	1.59, 1.45
				3.09, 3.09 (C $\delta$ H)
				3.08, 3.08
				8.46 (N $\delta$ H)
				8.38
Gln <sup>3</sup>	8.51	5.22	1.92, 1.92	2.06, 2.06 (C $\gamma$ H)
	8.53	5.26	1.95, 1.95	2.01, 2.01
				7.03, 6.56 (NH <sub>2</sub> )
				7.04, 6.55
Als(S) <sup>4</sup>	8.06	4.90	3.58, 2.53	
	7.96	5.07	3.59, 2.36	
Ala(S) <sup>5</sup>	8.93	4.47	2.53, 2.35	
	8.96	4.12	2.54, 2.19	
Ala(N) <sup>6</sup>	10.90	4.65	3.03, 2.96	
	11.27	4.51	3.11, 2.94	
Phe <sup>7</sup>	8.70	4.51	3.14, 2.84	<i>b</i> (C2,6H)
	7.50	4.97	3.00, 2.70	7.08
Gly <sup>8</sup>	7.43	4.08, 4.08		
	8.91	5.19, 3.61		
Pro <sup>9</sup>		3.95	1.90, 1.72	2.05, 1.89 (C $\gamma$ H)
		4.05	1.78, 1.01	1.66, 1.66
				3.72, 3.42 (C $\delta$ H)
				3.84, 3.35
Phe <sup>10</sup>	8.92	3.97	2.99, 2.99	7.09 (C2,6H)
	8.78	4.77	3.35, 2.65	7.21
Abu(S) <sup>11</sup>	7.86	4.49	3.25	1.16 (methyl)
	9.37	4.37	3.20	0.73
Phe <sup>12</sup>	8.21	4.66	3.36, 3.00	
	9.00	4.61	3.01, 2.94	
Val <sup>13</sup>	7.38	4.23	1.78	0.98, 0.85
				(methyl)
	8.98	3.84	2.53	1.07, 0.86
Ala(S) <sup>14</sup>	8.81	3.30	2.84, 2.59	
	8.81	3.20	2.75, 2.61	
HO-Asp <sup>15</sup>	7.42	4.58	4.24	3.60 (OH)
	7.46	4.81	4.75	6.08
Gly <sup>16</sup>	7.35	4.14, 4.00		
	7.12	4.09, 4.00		
Asn <sup>17</sup>	8.31	5.22	2.58, 2.58	7.39, 6.80 (NH <sub>2</sub> )
	8.31	5.21	2.59, 2.59	7.42, 6.78
Abu(S) <sup>18</sup>	7.58	4.40	3.50	1.23 (methyl)
	7.63	4.38	3.49	1.23
Lys <sup>19</sup>	8.34	3.79	1.77, 1.26	1.22, 1.03 (C $\gamma$ H)
	8.42	3.67	1.83, 1.13	0.98, 0.98



amino acid	N-H	C H	CmH	others
				1.47, 1.13 (Cδ)
				1.63, 1.16
				2.73, 2.62 (C ε H)
				2.74, 2.64
				α, α (N ε H)
				9.61, 7.97
LPE	2.30 (Cγ)	4.01, 3.96 (C1H2O)		3.69, 3.69 (C3H2OP)
	2.32	4.19, 4.06		3.70, 3.70
	1.54 (Cβ)	3.77 (C2H)		2.98, 2.98 (CH2N)
	1.55	3.97		2.91, 2.80
	1.27 (Cγ)	5.69 (C2OH)		3.87, 3.87 (POCH2)
	1.27	5.25		4.65, 4.03
	0.87 (methyl)			8.30 (NH2)
	0.87			8.13

<sup>a</sup>Not observed. <sup>b</sup>Not determined.

**Table 4.** Ro09-0198 induced platelets activation from various animal species

Ro09-0198		10 <sup>-5</sup> M	5 × 10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	control
Species					
Rat	*	57%	15%	3%	2%
	**	85%	40%	20%	—
	***	5 min	7 min	7 min	—
Rabbit	*	39%	17%	2%	2%
	**	60%	40%	15%	—
	***	7 min	8 min	10 min	—
Human	*	17%	9%	3%	4%
	**	40%	20%	3%	—
	***	1 min	1 min	3 min	—

5 × 10<sup>8</sup> platelets from various animal species were incubated with Ro09-0198 at 37°C.

\*; serotonin release

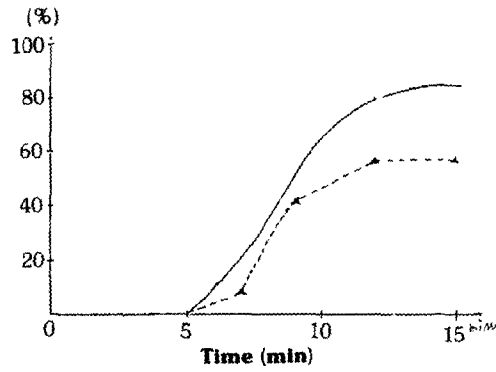
\*\*; relative light transmittance

\*\*\*; lag time

일치하는 결과라 하겠다.

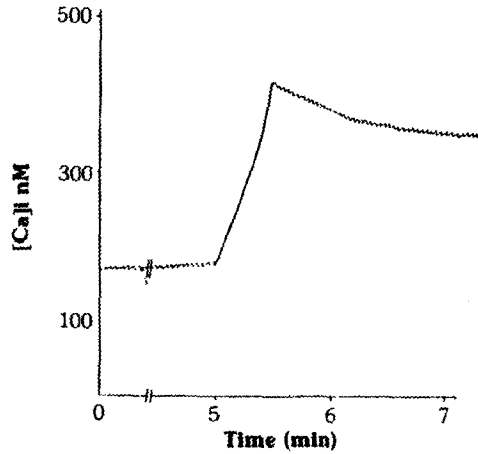
혈소판 활성화 기전에 대해서는 peptide가 분자량 300 정도를 통과시킬 수 있는 pore를 형성하는 점에 착안하여 혈소판막에 Ca ion을 통과시킬 수 있는 pore 형성의 가능성이 있으므로 peptide를 가한 뒤의 혈소판내 Ca 농도의 변화를 quin-2를 이용하여 검토하였다.

Fig. 7과 8에서 보는 바와 같이 혈소판 응집이 일어나기 시작하는 5분 경에 Ca influx가 일어나 460 nM 정도까지의 세포내 Ca 농도의 증가가 일어남을 볼 수 있었다. 또한 peptide 농도에 비례하여 Ca influx도 증가함을 알 수 있었다.

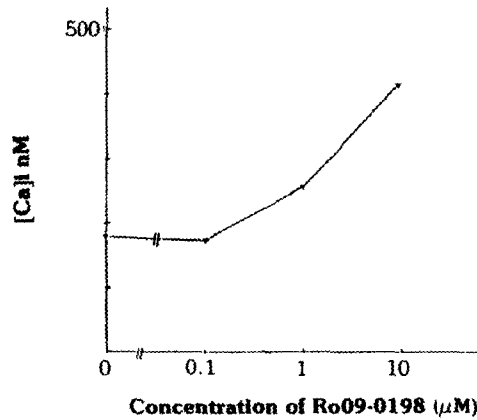


**Fig. 6.** Rat platelets activation by Ro09-0198  $5 \times 10^8$  rat platelets were incubated with  $10^{-5}$ M Ro09-0198 at  $37^\circ\text{C}$ .

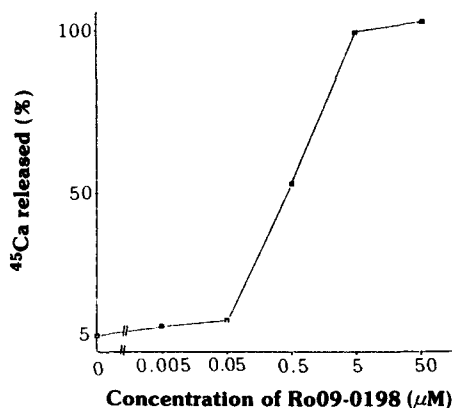
— aggregation  
 ---- serotonin release



**Fig. 7.**  $\text{Ca}^{++}$  uptake of rat platelets induced by Ro09-0198. Response of quin-2 loaded rat platelets to addition of Ro09-0198 ( $10 \mu\text{M}$ ) was calculated from the ratio  $F/F_{\text{max}}$ .



**Fig. 8.**  $\text{Ca}^{++}$  uptake of rat platelets induced by Ro09-0198 (dose response)



**Fig. 9.** Release of  $^{45}\text{Ca}$  from liposomes induced by Ro09-0198. Liposomes composed of egg-yolk phosphatidyl choline, egg-yolk phosphatidylethanolamine, dicetylphosphate and cholesterol (molar ratio, 0.75:0.25:0.1:1.0) were swollen in 0.3M glucose containing  $^{45}\text{Ca}$ .

이같은 결과가 PE-peptide 결합에 이은 cluster 형성에 의한 것인가를 확인하기 위해  $^{45}\text{Ca}$ 을 함유한 PE liposome에 peptide를 가해  $^{45}\text{Ca}$  release를 보았다.

$^{45}\text{Ca}$  release는 5 $\mu\text{M}$  peptide에서 거의 100% 일어났으며 이는 peptide의 Ca ionophore로서의 기능을 보여주는 좋은 예라 할 수 있겠다.

이상으로 본 peptide의 정맥내 투여에 의한 돌연사는 혈액내의 순간적 고농도 투여에 의해 적혈구 용혈과 혈소판 응집에 의한 혈전형성에 의한 것을 알 수 있었으며 항암작용이 나타나는 농도는 이보다 1000배 정도 낮은 농도로 rat에 별다른 이상을 볼 수 없었으므로 임상응용에는 별문제가 없는 것으로 판명되었다. 항암기전에 대해서는 세포분화의 중간과정에 proton pump가 주된 역할을 한다는 보고와 proton pump의 boundary lipid로서 PE가 이 효소의 활성유지에 절대적으로 필요하다는 논문이 최근 여러 그룹에 의해 발표되는 것으로 보아 PE-peptide complex 형성에 의해 Tcell 분화의 switch가 중간단계까지 분화과정을 같이하던 suppress T cell과 cytotoxic T cell 중 cytotoxic T cell쪽으로만 열리기 때문이 아닌가 생각된다. 혈소판 활성화도 serotonin, histamin, PAF 등의 release에 의한 macrophage, neutrophile의 동원에 의한 것일 가능성도 생각할 수 있다.

### 참고문헌

- Choung, S.Y., Kobayashi, T., Inoue, J., Takemoto, K., Ishitsuka, H. and Inoue, K. (1988b): Hemolytic activity of a cyclic peptide Ro09-0198 isolated from *Streptovorticillium*, *Biochim. Biophys. Acta*, **940**, 171-179.
- Choung, S.Y., Kobayashi, T., Takemoto, K., Ishitsuka, H. and Inoue, K. (1988a): Interaction of a cyclic peptide, Ro09-0198, with phosphatidylethanolamine in liposomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **940**, 180-187.
- Wakamatsu, K., Choung, S.Y., Kobayashi, T., Inoue, K., Higashijima, T. and Miyazawa, T. (1990): Complex formation of peptide antibiotic Ro09-0198 with lysophosphatidylethanolamine:  $^1\text{H}$  NMR analyses in dimethyl sulfoxide solution, **29**, 113-118.