

Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 117<sup>1)</sup>

## **L-Arginyl-D-*allo*-threonyl-L-phenylalanin, ein Aminosäure-Antagonist aus dem Pilz *Keratinophyton terreum***

Wilfried A. König\*, Wolfgang Loeffler\*\*, Wilhelm H. Meyer\*\* und Rainer Uhmann\*

Chemisches Institut, Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen\*, D-7400 Tübingen 1, Auf der Morgenstelle, und Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie I\*\*, der Universität Tübingen

Eingegangen am 4. Oktober 1972

---

Aus Laboratoriumskulturen eines Dermatophyten wurde eine Substanz isoliert, die Pilze (*Paecilomyces varioti*, *Mucor miehei*), nicht aber Bakterien (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) hemmt. Die antibiotische Wirkung wird durch L-Histidin und L-Threonin aufgehoben. Die Struktur des Antibioticums wurde durch gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen als L-Arginyl-D-*allo*-threonyl-L-phenylalanin erkannt und durch Vergleich mit dem synthetischen Tripeptid L-Arginyl-DL-*allo*-threonyl-L-phenylalanin bestätigt. Synthetisches L-Arg-L-Thr-L-Phe ist antifungisch inaktiv. Bedingungen für Fermentation und Gewinnung des Antibioticums werden angegeben.

### **Metabolic Products of Microorganisms, 117<sup>1)</sup>**

#### **L-Arginyl-D-*allo*-threonyl-L-phenylalanine, an Amino Acid Antagonist from the Fungus *Keratinophyton terreum***

An antibioticly active tripeptide was isolated from laboratory cultures of the dermatophyte *Keratinophyton terreum*. Inhibitory effects have been observed on fungi (*Paecilomyces varioti*, *Mucor miehei*) but not on bacteria (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*). The inhibition is antagonized by L-histidine and by L-threonine. The structure was elucidated by gas chromatographic and mass spectrometric investigations and was confirmed by comparison with synthetic L-arg-DL-*allo*-thr-L-phe. Synthetic L-arg-L-thr-L-phe does not show antifungal activity. Conditions for the fermentation and isolation of the antibiotic are reported.

---

Es ist bekannt, daß einige Dermatophyten Antibiotica erzeugen. Die Produzenten des gleichen Wirkstoffes sind nicht beliebig unter den vielen Arten verteilt, sondern in eigenartiger Weise gruppiert<sup>2,3)</sup>. Die Wirkung von zwei der Antibiotica aus Dermatophyten wird durch Aminosäuren aufgehoben<sup>4)</sup>.

1) 116. Mittell.: W. A. König, H. Kneifel, E. Bayer, G. Müller und H. Zähler, J. Antibiotics, im Druck.

2) B. Haller und W. Loeffler, Arch. Mikrobiol. 65, 181 (1969).

3) W. Loeffler, C. R. des Communications du Ve Congres de la Société Internationale de Mycologie Humaine et Animale (SIMHA/ISHAM), Paris, 5–10 juillet 1971, S. 320 (1971).

4) Vgl. R. Schindler, Isolierung und Charakterisierung eines Antibioticums aus *Nannizzia gypseae*, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1970.

Bei der Suche nach neuen Antibiotica stießen wir im Kulturmedium des Pilzes *Keratinophyton terreum* auf eine Substanz, die das Wachstum von Pilzen (*Paecilomyces varioti*, *Mucor miehei*), jedoch nicht von Bakterien (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) hemmt. In der vorliegenden Mitteilung wird die Isolierung und Konstitutionsermittlung beschrieben. Vermutlich handelt es sich um das erste Antibioticum, dessen Wirkung durch L-Histidin aufgehoben wird.

Das von dem benutzten Stamm in das Medium ausgeschiedene Antibioticum konnte aus Filtraten bewegter Submerskulturen durch Ionenaustauscher-Chromatographie an Dowex 50 WX 2 vorgereinigt und durch präparative Papierchromatographie oder durch Bio-Gel-Filtration isoliert werden. Das farblose Produkt ergab auf dem Dünnschicht-Chromatogramm mit Ninhydrin-Reagens eine violette Farbreaktion, was auf das Vorliegen einer Aminosäure oder eines Peptides hinwies. Das Dünnschicht-Chromatogramm zeigte in geringer Menge als weitere Komponente Lysin.

Die Aminosäureanalyse des Antibioticums nach der Ionenaustauscher-Methode<sup>5)</sup> ergab drei Aminosäuren im gleichen Verhältnis, die mit der Retentionszeit von Threonin, Phenylalanin und Arginin eluiert wurden.

Es ließ sich durch gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung der Trifluoracetyl-derivate<sup>6,7)</sup> zeigen, daß Phenylalanin und Arginin im Totalhydrolysat des Antibioticums vorliegen (Vergleich mit authentischen Substanzen). Die dritte Aminosäure, die bei der Aminosäureanalyse als Threonin erscheint, stimmt beim Vergleich mit dem Trifluoracetyl-Derivat von Threonin zwar im Massenspektrum, nicht aber in der gaschromatographischen Retentionszeit überein, sondern ist identisch mit *allo*-Threonin.

Die Ermittlung der Konfiguration der Aminosäuren des Antibioticums erfolgte teilweise gaschromatographisch und für alle drei Aminosäuren auch enzymatisch. Für die gaschromatographische Bestimmung wurden die Trifluoracetylaminosäureisopropylester hergestellt und an einer optisch aktiven stationären Phase<sup>8,9)</sup> untersucht. Phenylalanin liegt danach in der L-Konfiguration vor, während das *allo*-Threonin in der D-Form auftritt. Die enzymatische Bestimmung der Konfiguration erfolgte durch Inkubation des Antibioticum-Hydrolysates mit L-Aminosäure-Oxidase (L-AOD) bzw. mit D-Aminosäure-Oxidase (D-AOD) und Dünnschicht-Chromatographie der Reaktionsprodukte. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Sie bestätigen die gaschromatographisch ermittelten Resultate und zeigen zudem, daß Arginin in der L-Form vorliegt.

Es ist bemerkenswert, daß kürzlich auch in einem mit Telomycin verwandten Peptid-Antibioticum aus einer *Streptomyces*-Art D-*allo*-Threonin nachgewiesen wurde<sup>10)</sup>.

Wie die Aminosäureanalyse beweist, liegen die drei Aminosäuren in gleichem Verhältnis im Peptid vor. Eine massenspektrometrische Sequenzanalyse von Argininpeptiden wird durch die stark polare Guanidingruppe des Arginins erschwert.

<sup>5)</sup> S. Moore, D. H. Spackman und W. H. Stein, Anal. Chem. **30**, 1185 (1958).

<sup>6)</sup> C. W. Gehrke und D. L. Stalling, Separat. Sci. **2**, 101 (1967).

<sup>7)</sup> E. Gelpi, W. A. König, J. Gibert und J. Oro, J. Chromatogr. Sci. **7**, 604 (1969).

<sup>8)</sup> E. Gil-Av und B. Feibush, Tetrahedron Lett. **1967**, 3345.

<sup>9)</sup> W. A. König, W. Parr, H. A. Lichtenstein, E. Bayer und J. Oro, J. Chromatogr. Sci. **8**, 183 (1970).

<sup>10)</sup> A. Bodansky, M. Bodansky, K. L. Perlman und D. Perlman, J. Antibiotics **25**, 325 (1972).

Tab. 1. Ermittlung der Konfiguration der Spaltprodukte im Hydrolysat des Antibioticums. Dünnschicht-Chromatographie: Kieselgel G (Merck), n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)

Spaltprodukt	$R_F$	Ninhydrin-Reaktion		Konfiguration
		nach L-AOD	nach D-AOD	
Arg	0.20	(+) <sup>a)</sup>	+	L
Thr	0.35	+	---	D
Phe	0.68	--	+	L

<sup>a)</sup> Färbung deutlich schwächer als nach D-AOD-Behandlung. Die noch vorhandene Anfärbbarkeit mit Ninhydrin ist durch die Aminogruppe des Arginin-Abbauproduktes  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -guanidinovaleriansäure bedingt und hat nahezu diagnostische Bedeutung.

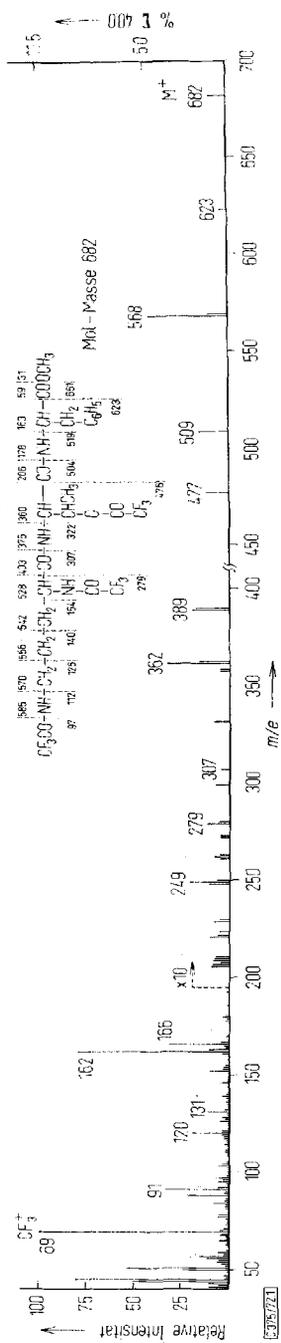
Bisher sind nur Argininpeptide bekannter Sequenz massenspektrometrisch untersucht worden<sup>11,12)</sup>. Dabei wird der Guanidylrest durch Reaktion mit Acetylaceton in einen 4,6-Dimethylpyrimidylaminorest übergeführt<sup>13)</sup> und das Peptidderivat anschließend permethyliert. Eine weitere Möglichkeit, Argininreste in Peptiden zu modifizieren, besteht in der Reaktion mit verdünnter wäßriger Hydrazinlösung, wobei der Argininrest in einen Ornithinrest übergeführt wird<sup>13)</sup>. Wir wandten diese Methode auf das Antibioticum an und führten anschließend eine Veresterung und Trifluoracetylierung durch. Das Massenspektrum des so erhaltenen Derivates ist in Abb. 1 dargestellt.

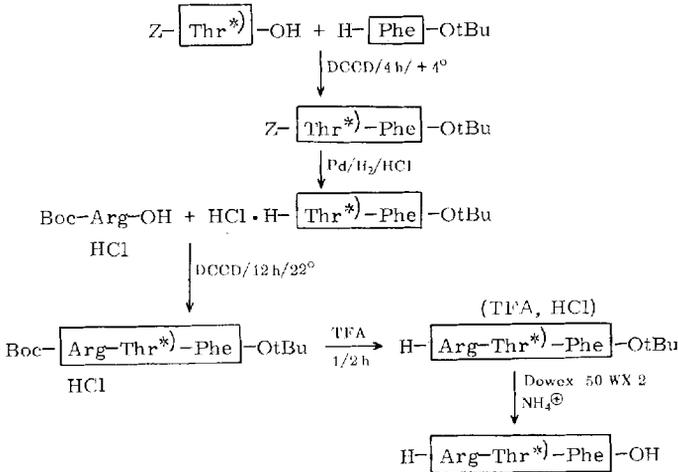
Aus dem Spektrum lassen sich die Mol.-Masse ( $m/e$  682) und die Sequenz eines Tripeptids Arginyl-threonyl-phenylalanin eindeutig ableiten. Die Fragmentierung erfolgt vorwiegend beiderseits der CO-Gruppen der Peptidbindungen, woraus die sequenz-spezifischen Fragment-Ionen  $m/e$  279, 307, 477 (= 476 + H) und 623 resultieren. Die leichte Eliminierung eines Trifluoressigsäure- bzw. Trifluoressigsäureamid-Moleküls führt zu sekundären Sequenzpeaks bei  $m/e$  166 (= 279 - CF<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>), 249 (= 476 - CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H - CF<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>), 362 (= 476 - CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H), 390 (= 504 - CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H) und 509 (= 623 - CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H). Auch das Molekül-Ion spaltet sehr leicht ein Trifluoressigsäure-Molekül ab, was zum intensiven Fragment bei  $m/e$  568 führt. Das C-terminale Phenylalanin wird durch das Ion der Masse 162 angezeigt (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH=CHCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

Der Beweis für die Richtigkeit der vorgeschlagenen Strukturformel wurde durch die Synthese des Tripeptids L-Arg-DL- $\alpha$ Thr-L-Phe erbracht (Tab. 2).

Mit Ausnahme des spezifischen Drehwertes gleicht das synthetische Tripeptid dem natürlichen Produkt in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften vollkommen (UV-, IR- und NMR-Spektren, DC, Massenspektrum nach Hydrazinolyse, Veresterung mit HCl/Methanol und Trifluoracetylierung). Die Werte der Aminosäureanalyse stimmen ebenfalls exakt überein.

- 11) D. W. Thomas, B. C. Das, S. D. Gero und E. Lederer, Biochem. Biophys. Res. Commun. **32**, 519 (1968).
- 12) P. A. Leclercq, L. C. Smith und D. M. Desiderio, Biochem. Biophys. Res. Commun. **45**, 937 (1971).
- 13) M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, E. J. Vinogradova, M. Y. Feigina, A. A. Kiryushkin, N. A. Aldanova, Y. B. Alakhov, V. M. Lipkin und B. V. Rosinow, Experientia **23**, 428 (1967).



Tab. 2. Synthese von L-Arg-DL-*a*Thr-L-Phe und von L-Arg-L-Thr-L-Phe

\* Thr als DL-*allo*- oder als L-Isomeres.

Bei der Fermentation wird das Maximum der antibiotischen Aktivität nach etwa 48 h erreicht (Abb. 2), danach nimmt mit dem weiteren Ansteigen des pH-Wertes die Antibiotica-Konzentration von 3.0 mg/ml (pH 7.5) auf ca. 300  $\mu\text{g/ml}$  (pH 8.7) rasch ab und sinkt bald unter die Nachweisgrenze. Schüttelkulturen zeigen einen ähnlichen Fermentationsverlauf, entwickeln sich aber langsamer; das Aktivitätsmaximum ist dort nach fünf bis sechs Tagen erreicht.

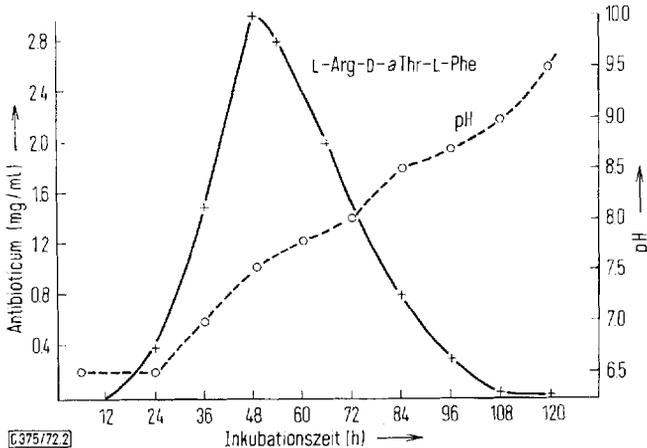


Abb. 2. Konzentration von L-Arg-D-*a*Thr-L-Phe (nach biologischer Bestimmung) und pH im Verlaufe der Fermentation

Die gesamte antifungische Aktivität (gemessen als Hemmung des Testpilzes *Paeicomyces variotii* auf Hefeextrakt- oder Malzagar) ist auf eine einzige Substanz, L-Arg-D-*a*Thr-L-Phe, zurückzuführen. Enthalten die Testmedien oder die Präparate L-



Die Untersuchungen werden durch Mittel der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* (DFG – SFB 76) gefördert. Unser Dank gebührt der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* sowie den Herren Professoren Dr. E. Bayer und Dr. H. Zühner. An den experimentellen Arbeiten waren Frau U. Wöll und Herr J. Wöll beteiligt; auch ihnen danken wir herzlich.

## Experimenteller Teil

*Aufarbeitung:* Beim Ernten von Fermenterkulturen mit möglichst maximalem Wirkstoffgehalt (Inkubationszeit 48 bis 60 h) wurden nur die Filtrate verarbeitet, die Myzelien aber verworfen, weil sie nur wenig Antibioticum enthielten. Aus dem Filtrat ließen sich störende, inaktive Substanzen durch wiederholte Extraktion mit Chloroform (insgesamt etwa gleiches Vol. wie Filtrat) entfernen. Nach Einengen der wäbr. Phase auf ungefähr ein Drittel und Einstellen von pH 7.0 ergaben Trockengewichtsbestimmungen von Proben für einen Fermenter mit 10 Liter Nutzvolumen 217 g Feststoffe (Wirkstoffgehalt 15%, Präparat A). Das vorgereinigte Konzentrat wurde portionsweise auf eine Säule mit Ionenaustauscher Dowex 50 WX 2 gegeben. Nach Waschen mit Wasser ließen sich weitere inaktive Begleitstoffe mit verd. Ammoniumhydroxid bei pH 8.8 und das Antibioticum schließlich bei pH-Werten um 9.8 eluieren. Umkehren der Austauschersäule<sup>15)</sup> führte zu höheren Ausbeuten als Eluieren mit der nicht veränderten Säule. In den vorgereinigten, zur Trockne eingedampften Fraktionen mit guter antibiotischer Aktivität (9 g) betrug der Wirkstoffanteil etwa 55% (Präparat B, Ausb. 15%, bezogen auf Präparat A), die Verunreinigungen bestanden im wesentlichen aus L-Lysin und enthielten vermutlich auch das dem Antibioticum entsprechende *all-L-Tripeptid*. Die weitere Reinigung erfolgte entweder – für kleine Mengen bei großen Verlusten – papierchromatographisch (Streifenchromatogramme<sup>16)</sup>; Papier: NM 214, Macherey, Nagel & Co., Düren; Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1;  $R_F$  von L-Arg-D-aThr-L-Phe = 0.7, von L-Lys = 0.35) oder – bei größeren Ansätzen und mit geringeren Verlusten – durch Filtration über Bio-Gel P 2 in Säulen. Im Bio-Gel-Filtrat wurde die Transmission bei 254 nm fortlaufend registriert. Die vereinigten und lyophilisierten Fraktionen des Bio-Gel-Filtrates mit den höchsten Antibiotica-Gehalten (Präparat C) wogen 1.9 g und wiesen Wirkstoffgehalte von mindestens 95% auf (Ausb. 38%, bezogen auf Präparat B). Als Verunreinigung war auf der Dünnschichtplatte und bei der GC-MS-Untersuchung Lysin in Spuren noch nachweisbar. Es wurde nicht versucht, die Verunreinigung zu entfernen, da sie als solche erkannt und identifiziert war und bei den weiteren Untersuchungen nicht störte.

Zur Produktion des Antibioticums benutzten wir den Stamm TÛ 534 – *Keratinophyton terreum* Randhawa et Sandhu 1964: Sabouraudia 3, 253 (*Eurotiaceae*, *Eurotiales*, *Ascomycetes*); asexuelles Stadium: *Chrysosporium indicum* Garg 1966: Sabouraudia 4, 262 (*Moniliales*, *Moniliales*, *Deuteromycetes*), Synonym: *Trichophyton indicum* Randhawa et Sandhu 1963: Mycopathol. Mycol. appl. (Den Haag) 20, 225 – *nom. illegit.*, non *Trichophyton indicum* (Castellani) Nannizzi 1934: Tratt. Micopat. Umana (Pavia) 4, 186 – quod est *Trichophyton concentricum* Blanchard.

Als *Testorganismen* zur Prüfung auf antibiotische Aktivität dienten die beiden Pilzstämme TÛ 137 *Paecilomyces varioti* Bainier und TÛ 284 *Mucor miehei* Cooney et Emerson sowie zwei Bakterienstämme, TÛ 203 *Bacillus subtilis* Cohn und *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers K 12.

Nährmedien wurden im Autoklaven sterilisiert, und zwar Volumina bis 2 Liter 20 min bei 120°, größere Volumina 30 min bei 134°. Hinsichtlich der Zusammensetzung der Nährmedien hielten wir uns an die Angaben bei Haller und Loeffler<sup>2)</sup>. Zur Stammhaltung für

<sup>15)</sup> K. Dorfner, Ionenaustauscher, Verlag Walter de Gruyter, Berlin 1970.

<sup>16)</sup> F. Cramer, Papierchromatographie, 5. Aufl., Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1962.

Pilze, aber auch für manche Agardiffusionstests, wurde Hefeextrakt-Agar benutzt, für Bakterienstämme Nähragar bzw. Tartrat-Agar<sup>17)</sup>. Das Fermentationsmedium zur Antibiotica-Produktion setzte sich wie folgt zusammen: 2% Sojamehl (Henselwerk, Magstadt), 2% Mannit (Deutsche Maizena-Werke, Hamburg), 0,2% Ammoniumsulfat (p. A., Merck), entionisiertes Wasser, pH 7,5, vor der Sterilisation mit Natronlauge eingestellt; Vol. 10 Liter, Belüftung 2 Liter/min, Rührgeschwindigkeit 250 U/min, Temperatur 27°.

*Impfmaterial:* Die Pilzstämmen T $\ddot{U}$  534 (Inkubationstemp. 27°), T $\ddot{U}$  137 und T $\ddot{U}$  284 (37°) wuchsen 2–6 d in Schrägagar-Röhrchen mit Hefeextrakt-Agar. Nach anschließender Aufbewahrung (und evtl. weiterer Inkubation) bei Raumtemp. während 2–8 Wochen gewannen wir Suspensionen von Sporen oder Konidien und Hyphenfragmenten durch Abschwemmen mit wäbr. Dodecylhydrogensulfat-Natrium (Merck) oder Tween 80 (Serva, Heidelberg) in Konzentrationen von je 100 mg/l, Dosierung 8 ml pro Schrägagar-Kultur. Die von einem Röhrchen gewonnene Keimsuspension wurde für 100 ml Keimschichtagar oder, nach Verdünnen mit 20 ml sterilem, entionisiertem Wasser, je 1 ml Suspension pro 100 ml Medium zur Beimpfung von Schüttelkulturen verwendet. *Bacillus subtilis* stand in Form einer Sporensuspension (10<sup>9</sup> Sporen/ml) zur Verfügung, wovon für Tests auf Tartrat-Agar 2 ml, für Tests auf Nähragar 1 ml zu je 100 ml Keimschichtagar gegeben wurden. Von *Escherichia coli* wurden pro 100 ml Keimschichtagar 4 ml einer 48-h-Kultur (27°, rotierende Schüttelmaschine, Medium: Nährlösung für Bakterien = Nähragar ohne Agarkomponente) verwendet.

*Weitere Inkubationsbedingungen* wandten wir in weitgehender Übereinstimmung mit *Haller* und *Loeffler*<sup>2)</sup> an, benutzten jedoch für Schüttelkulturen ausschließlich die rotierende Schüttelmaschine, als Gefäße 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit einem „seitlichen Einstich“ („Schikane“) und je 100 ml Füllung. Fermenter mit 10 Liter Nutzvolumen wurden mit je zehn 4–5 d lang inkubierten Schüttelkulturen beimpft. Testplatten wurden mit Grund- und Keimschichten hergestellt, höchstens 6 d bei +4° aufbewahrt und nach dem Auflegen von Testrondellen oder -streifen 16 d bei 37° bebrütet.

*Hydrolyse und Aminosäure-Analysen:* 1 mg Antibioticum bzw. synthetisches Tripeptid wurden in 1 ml 6 N HCl 20 h bei 100° hydrolysiert. Nach Entfernen der Salzsäure im N<sub>2</sub>-Strom wurde das Hydrolysat in einem automatischen Aminosäure-Analysator (Unichrom, Beckman) untersucht.

*Trifluoracetyl-derivate der Aminosäuren*<sup>6,7,9)</sup>: Eine 100  $\mu$ g Antibioticum entsprechende Menge des Hydrolysats wurde in 300  $\mu$ l Isopropylalkohol/HCl (1.25 N) 60 min auf 100° erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im N<sub>2</sub>-Strom wurden 200  $\mu$ l CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 50  $\mu$ l Trifluoacetanhydrid zugegeben und 60 min bei 22° in einem Schraubdeckelglas mit Teflon-Einlage im Deckel stehengelassen. Danach wurde das Reagens im N<sub>2</sub>-Strom entfernt und der Rückstand in 50  $\mu$ l CHCl<sub>3</sub> gelöst.

Für die Herstellung eines vollständig trifluoracetylierten Argininderivates wurde eine weitere Probe nach Veresterung (s. o.) in 200  $\mu$ l CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 50  $\mu$ l Trifluoacetanhydrid 5 min bei 150°<sup>6,9)</sup> in einem Schraubdeckelgläschen erhitzt.

*Derivate des Antibioticums:* 200  $\mu$ g Antibioticum wurden in 50  $\mu$ l Hydrazinhydrat und 150  $\mu$ l Wasser 60 min bei 80° gehalten. Nach Trocknen über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> i. Vak. wurde der Rückstand in 500  $\mu$ l Methanol/HCl (1.25 N) 60 min bei 80° verestert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im N<sub>2</sub>-Strom wurde der Rückstand in 200  $\mu$ l CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 100  $\mu$ l Trifluoacetanhydrid 60 min bei 22° stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt massenspektrometrisch untersucht.

<sup>17)</sup> R. Hütter, K. Poralla, H. G. Zachau und H. Zähler, *Biochem. Z.* **344**, 190 (1966).

**Bestimmung der Konfiguration der Aminosäuren:** Die Trifluoracetylaminosäure-isopropylester wurden im Varian-Aerograph 1520, 150 m Stahlkapillare, 0.78 mm Innendurchmesser, belegt mit TFA-L-Phe-L-Leu-Cyclohexylester<sup>9)</sup>, Säulentemp. 140° isotherm, Trägergas 15 ml He/min, untersucht. Die Enantiomeren von Threonin, *allo*-Threonin und Phenylalanin werden vollständig getrennt. Die Zuordnung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und Mischeinspritzung mit Standard-Aminosäuren (Retentionszeiten: D-Thr 18.7 min, L-Thr 19.5 min, D-*α*-Thr 27.1 min, L-*α*-Thr 29.2 min, D-Phe 213 min und L-Phe 238 min).

**Enzymatische Konfigurationsbestimmung:** Zu einer Hälfte von 5 mg Hydrolysat in 5 ml entionisiertem Wasser wurden 0.5 mg L-Aminosäure-Oxidase<sup>18)</sup>, zur anderen Hälfte 0.5 mg D-Aminosäure-Oxidase gegeben. Die Chromatographie erfolgte nach 12 h Inkubation der Ansätze bei 37° (Tab. 1).

**Gaschromatographie-Massenspektrometrie:** Die Untersuchungen wurden an einem LKB 9000 Kombinationsgerät durchgeführt. Die gaschromatographischen Trennungen erfolgten an einer 2-m-Glassäule, gepackt mit 3% OV 17 auf Chromosorb WAW. Die Separatortemp. betrug 230°, die Ionenquellen-Temp. 250°. Die Massenspektren wurden bei 70 eV mit 3.5 KV Beschleunigungsspannung aufgenommen.

*Synthese von L-Arg-DL- $\alpha$ Thr-L-Phe und von L-Arg-L-Thr-L-Phe*

1. *L-Phenylalanin-tert-butylester* (Phe-OtBu): Die Darstellung erfolgt durch Umsetzung von Z-Phe mit Isobutylen/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und anschließende Hydrierung<sup>19)</sup>. Öl, erstarrt bei +6°.

2. *Benzoyloxycarbonyl-DL-(allo)-threonin* [Z-DL-(*allo*)-Thr]: Zur Suspension von 5.95 g (50 mmol) DL-(*allo*)-Threonin (Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio) in 50 ml Dioxan/Wasser (1:1) werden unter Rühren und Eiskühlung langsam 8 ml – 9.5 g (55 mmol) Benzoyloxycarbonylchlorid getropft. Dabei wird mit Hilfe eines Autotitrators 4 N NaOH in der Weise zugegeben, daß der pH-Wert der Lösung nicht unter 8 sinkt. Nach 60 min ist die Reaktion beendet, der pH-Wert wird auf 9 erhöht und die alkalische Lösung dreimal mit je 30 ml Äther extrahiert. Die wäbr. Phase wird mit 50 ml Essigester überschichtet und mit Salzsäure auf pH 2 gebracht.

Die Essigester-Extraktion wird noch zweimal wiederholt. Nach Trocknen und Einengen der organischen Phase bleibt ein farbloses Öl zurück; Ausb. 12 g (95%);  $R_F^{20)}$  0.65.

Z-L-Thr wird auf gleiche Weise erhalten: Kristalle, Schmp. 103–104°,  $[\alpha]_D^{25)}$ : –4.1° ( $c = 1.05$ , Methanol),  $R_F^{20)}$  0.65.

3. *Benzoyloxycarbonyl-DL-(allo)-threonyl-L-phenylalanin-tert-butylester* [Z-DL-(*allo*)-Thr-L-Phe-OtBu]: 1.1 g (5 mmol) L-Phenylalanin-*tert*-butylester und 1.26 g (5 mmol) Benzoyloxycarbonyl-DL-(*allo*)-threonin werden in 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und bei –4° mit 2 ml einer 2.5 M DCCD-Lösung versetzt. Nach 4 h wird der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und die Lösung mit kalter Citronensäurelösung, Wasser und NaHCO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels bleibt ein farbloses Öl zurück; Ausb. 1.92 g (84%);  $R_F^{20)}$  0.72; Massenspektrum: Molekülpeak bei  $m/e$  456.

Z-L-Thr-L-Phe-OtBu wird analog mit 87.5% Ausb. erhalten.

4. *DL-(allo)-Threonyl-L-phenylalanin-O-tert-butylesterhydrochlorid* [DL-(*allo*)-Thr-L-Phe-OtBu·HCl]: Die Lösung von 1.83 g (4 mmol) Z-DL-(*allo*)-Thr-L-Phe-OtBu in 80 ml Me-

<sup>18)</sup> M. Kunitz, J. gen. Physiol. 30, 291 (1947),

<sup>19)</sup> G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Am. Chem. Soc. 82, 3359 (1960).

<sup>20)</sup> Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel G (Merck), n-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1).

thanol wird mit 20 mg Pd/Aktivkohle hydriert. Während der Reaktion wird der pH-Wert mit 1 N HCl durch eine pH-Stat-Anordnung auf 5.5 gehalten. Nach Filtrieren und Abziehen des Lösungsmittels bleibt das Hydrochlorid des Dipeptid-*tert*-butylesters in quantitativer Ausb. als Öl zurück;  $R_F^{20}$  0.55.

*L-Thr-L-Phe-OtBu · HCl* wird analog in quantitativer Ausb. erhalten.  $R_F^{20}$  0.55.

5. *L-Arginyl-DL-(allo)-threonyl-L-phenylalanin* [L-Arg-DL-(allo)-Thr-L-Phe]: Zur Suspension von 1.0 g (4.7 mmol) Boc-Arg-OH · HCl und 1.4 g (3.9 mmol) Dipeptidesterhydrochlorid in 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> werden 0.45 ml Triäthylamin und bei +4° 1.9 ml einer 2.5 M DCCD/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Lösung gegeben. Die Mischung wird bei Raumtemp. über Nacht kräftig geschüttelt, schließlich wird der Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird 30 min mit 10 ml Trifluoressigsäure behandelt und danach die Lösung in 2 Liter kalten Äther eingegossen. Der Niederschlag wird in wenig Äthanol aufgenommen und erneut aus Äther ausgefällt. Nach Trocknen im Exsiccator über KOH erhält man ein leicht grau gefärbtes Pulver.

Das Produkt wird über Dowex 50 WX 2 in der Ammonium-Form chromatographiert. Zur Elution dient ein Gradient von 0–2% Ammoniak. Die lyophilisierte Fraktion enthält 277 mg des reinen Tripeptids; Ausb. 17%, Schmp. 155° (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ : +17.6° ( $c = 1.0$ , H<sub>2</sub>O). Dünnschicht-Chromatographie an Cellulose (Merck; Äthanol/Eisessig/Wasser 4:1:1):  $R_F$  0.68; Aminosäureanalyse: Thr 0.256, Phe 0.265, Arg 0.260. — UV (Wasser): Maxima bei 264, 258 und 251.2 nm.

C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (422.2) Ber. C 53.99 H 7.16 N 19.90 Gef. C 53.81 H 7.08 N 19.83

Auf gleiche Weise wurde das Tripeptid *L-Arginyl-L-threonyl-L-phenylalanin* gewonnen; Ausb. 267 mg (16%), Schmp. 134° (Zers.),  $[\alpha]_D^{25}$ : +7.6° ( $c = 1.0$ , H<sub>2</sub>O).

C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (422.2) Ber. C 53.99 H 7.16 N 19.90 Gef. C 52.95 H 7.35 N 19.21

[375/72]