

Dieter Orth¹⁾ und Theodor Wieland

Synthese des 3-Carbamoyl-pyridon-(6)-adenin-dinucleotids (6-Pyridon von NAD)

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Eingegangen am 22. Juli 1968)

Das Dinucleotid **9** wurde aus dem Nucleotid **8** und einem Guanidinium-Salz des Adenosin-5'-phosphorsäure-amids zusammengesetzt. **8** erhielt man aus dem Silbersalz des 3-Carbamoyl-pyridons-(6) (**1**) und 2.3.5-Tri-*O*-benzoyl-D-ribofuranosylchlorid über die *O*-Verbindung (**2**), die zum *N*-Ribosid (**3**) umgelagert und nach Entbenzoylierung und Acetonierung in 2'.3'-Stellung des Ribosids **4a** mit Cyanäthylphosphat und Dicyclohexylcarbodiimid in 5'-Stellung zum Nucleotid **8** phosphoryliert wurde. Die β -Verknüpfung in **4a** (und damit in **9**) wurde u. a. durch Korrelation mit dem analogen Glucosid **4b** so gut wie sichergestellt.

Vor einiger Zeit schienen am Pyridinring oxydierte Derivate des Wasserstoffübertragenden Coenzym Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) aufgrund bestimmter Beobachtungen an phosphorylierenden Mitochondrien²⁾ im Zusammenhang mit dem Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung interessant. Deshalb wurde das 4-Pyridon von NAD synthetisiert³⁾, und zwar aus NAD und 4-Methoxy-nicotinamid, das unter Katalyse von Schweinehirn-NAD-nucleosidase anstelle des Nicotinamidrings in das Coenzym eingebaut wurde. Da das 4-Pyridon von NAD in Gegenwart von Mitochondrien oder daraus gewonnenen phosphorylierenden Partikeln von Adenosintriphosphat nicht phosphoryliert wurde, sich also als unbeteiligt erwies, wurde die Synthese des 6-Pyridons von NAD (**9**) in Angriff genommen. Der enzymatische Weg ließ sich mit 6-Methoxy-nicotinamid⁴⁾ nicht verwirklichen. Hingegen kann 6-Amino-nicotinamid an die Stelle des Nicotinamidrestes von NAD gebracht werden⁵⁾, doch ließ sich im 6-Amino-Analogen die Aminogruppe nicht durch Diazotieren und Hydrolyse durch Sauerstoff ersetzen. Deshalb wurde das 6-Pyridon von NAD von Grund auf synthetisiert.

¹⁾ Dissertation, Univ. Frankfurt a. M. 1966.

²⁾ D. E. Griffiths und R. A. Chaplain, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **8**, 497, 501 (1962).

³⁾ G. Pfeleiderer, J. J. Holbrook und Th. Wieland, *Biochem. Z.* **338**, 52 (1963).

⁴⁾ D. Orth, Diplomarbeit, Univ. Frankfurt a. M. 1964.

⁵⁾ W. J. Johnson und J. D. McColl, *Federat. Proc.* **15**, 284 (1956).

Pyridon-(6)-carbonsäure-(3)⁶⁾ wurde über das gemischte Äthylkohlenensäureanhydrid⁷⁾ mit Ammoniak ins Amid **1** verwandelt. Diese Verbindung wurde nach *Wagner* und *Pischel*⁸⁾ als Silbersalz des ambidenten Lactim-Lactam-Anions mit 1-Chlor-2,3,5-tri-*O*-benzoyl-D-ribofuranose⁹⁾ zum *O*-Glycosid **2a** umgesetzt, das sich beim mehrstündigen Erhitzen mit Quecksilber(II)-bromid in Toluol⁸⁾ zum *N*-Ribosid **3a** umlagern ließ. **3a** zeigt im UV-Licht ein 6-Pyridon-Spektrum (wie in der Abbild.), während das Spektrum von **2a** dem Typ der Alkoxyipyridine¹⁰⁾ (mit großer Extinktion bei 235 m μ und längstwelliger Absorption bei 270 m μ) zugehört.

Aus dem Tribenzoylribosid **3a** konnten die Benzoylreste besser mit Na-Methylat in Methanol als mit Ammoniak abgespalten werden. Vor der Phosphorylierung in 5'-Stellung wurden die benachbarten OH-Gruppen des Nucleosids **4a** mit Aceton zum Isopropylidenacetal (**5**) umgesetzt. **5** konnte nach *Tener*¹¹⁾ mit Cyanäthylphosphat und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zum Cyanäthylphosphat **6** verestert werden, das mit Li-Hydroxid zur Phosphorsäure **7** und anschließend mit Dowex 50 (H⁺-Form) zum freien Nucleotid **8**, 3-Carbamoyl-pyridon-(6)-*N*¹-[D-ribofuranosid-5-phosphat] (UV-Spektrum in der Abbild.), hydrolysiert wurde.

Auch bei sehr schonender Hydrolyse mit Li-Hydroxid entstand über ihre Acetonverbindung **7'**, die dem Carbonamid **8** entsprechende Carbonsäure **8'**, die bei heißer Hydrolyse als Hauptprodukt anfiel. Sie ließ sich über das gemischte Anhydrid⁷⁾ mit Ammoniak zum Amid **8** zurückverwandeln. **7** und **7'** lassen sich durch Chromatographie am Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A-25, **8** und **8'** durch präparative Dünnschichtchromatographie oder durch Papierelektrophorese bei pH 6.5 oder durch Chromatographie an Dowex 50 trennen.

Zur Dinucleotidsynthese aus **8** und dem Adenylsäureteil eignete sich unter verschiedenen Methoden (u.a. Kupplung in wäßrigem Pyridin mit DCC¹²⁾ die Aktivierung der Adenosinphosphorsäure als Amid in Form des 1,3-Dicyclohexyl-guanidiniumsalzes¹³⁾. Aus diesem und dem Amid **8** konnte das entsprechende Dinucleotid **9** synthetisiert und aus dem Produktgemisch durch Chromatographie an DEAE-Sephadex in 17proz. Ausbeute rein gewonnen werden. Aus einem Ansatz der „Eintopf“-Kondensation¹²⁾ der Nucleotide **8** und **8'** mit AMP isolierten wir auch die Dinucleotidsäure **9'**.

Das UV-Spektrum von **9** ist in der Abbild. neben dem von **8** wiedergegeben. Durch das zusätzliche Adenin ist die Extinktion bei 260 m μ gegenüber der bei 297 m μ in **9** im Vergleich zum Mononucleotid **8** bedeutend erhöht. Da sich die Extinktions-

6) *J. H. Boyer* und *W. Schoen*, *Org. Syntheses*, Coll., Vol. **4**, 532 (1963).

7) *Th. Wieland* und *H. Bernhard*, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951).

8) *G. Wagner* und *H. Pischel*, *Arch. Pharmaz.* **295**, 373 (1962).

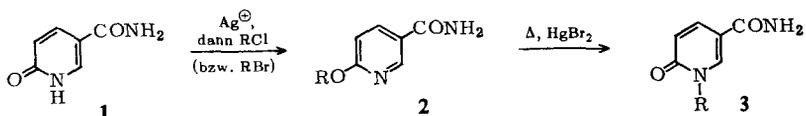
9) *J. Baddiley*, *J. G. Prescott*, *J. F. Buchanan* und *R. Hodges*, *J. chem. Soc. [London]* **1957**, 4769.

10) (Siehe z.B. bei *Th. Wieland*, *Ch. Fest* und *G. Pfeleiderer*, *Liebigs Ann. Chem.* **642**, 163 (1961).

11) *G. M. Tener*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 159 (1961).

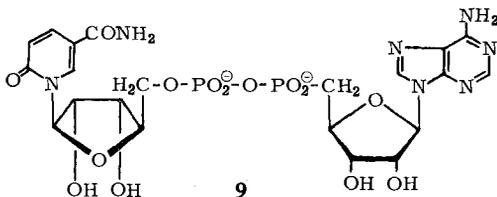
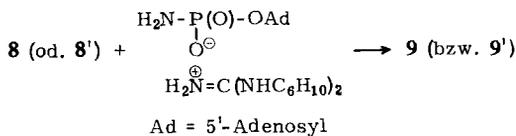
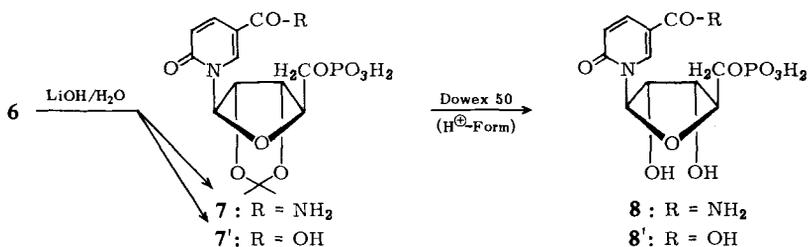
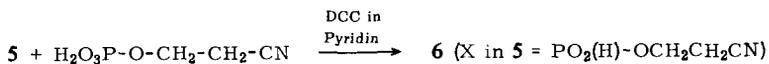
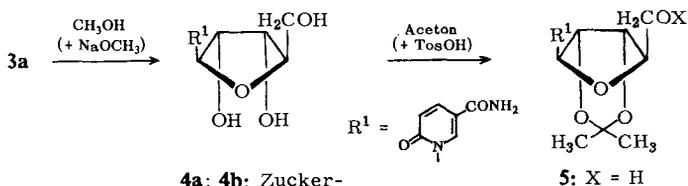
12) *N. A. Hughes*, *J. W. Kenner* und *A. R. Todd*, *J. chem. Soc. [London]* **1957**, 3733.

13) *H. G. Khorana*, *R. W. Chambers* und *J. G. Moffat*, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 3752 (1958); *K. G. Khorana*, ebenda **80**, 3756 (1958).



a: R = Tribenzoyl-ribofuranosyl

b: R = Tetraacetyl-glucopyranosyl

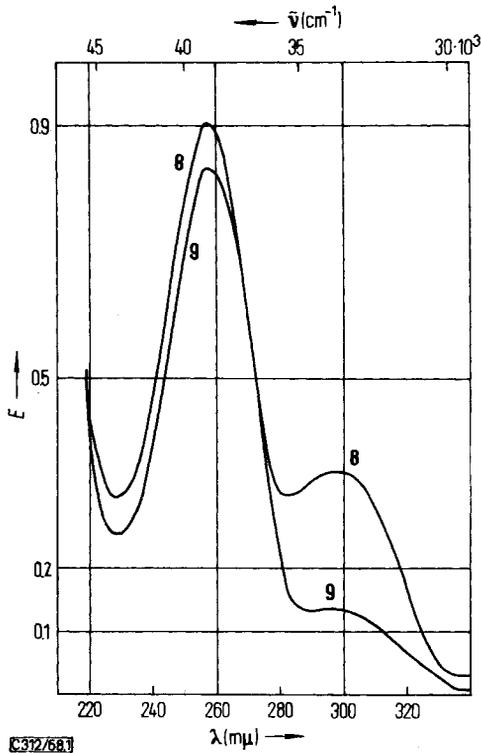


9': CO₂H statt CONH₂

DCC = Dicyclohexylcarbodiimid

koeffizienten von Dinucleotiden nicht additiv aus den Extinktionskoeffizienten ihrer Mononucleotide ergeben (intramolekulare Wechselwirkung der Chromophore), resultiert auch hier ein Defizit, das etwa dem am 4-Pyridon-NAD gegenüber den Spaltstücken beobachteten³⁾ entspricht.

| | 8 | AMP | 9 (gef.) | 9 (ber.) | Diff. |
|--------------------------------|------|------|----------|----------|-------|
| $\epsilon_{260} \cdot 10^{-6}$ | 13.2 | 15.0 | 21.9 | 28.2 | -6.3 |
| $\epsilon_{297} \cdot 10^{-6}$ | 5.28 | 0.0 | 3.58 | 5.28 | -1.7 |



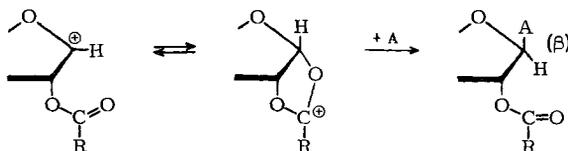
UV-Spektren in Wasser von **8** ($6.75 \cdot 10^{-11} m$) und **9** ($3.75 \cdot 10^{-11} m$)

Die Nucleotide lassen sich im Papierelektropherogramm (pH 6.5, 50 v/cm⁻¹) gut unterscheiden. **9** wandert doppelt so rasch zur Anode wie NAD, da es die positive Ladung am Pyridin-N verloren hat. Die Carbonsäure **9'** wandert etwa um 10% rascher als ihr Amid **9**, das Mononucleotid **8** fast doppelt so schnell wie **9**, und **8'** etwa 4mal so schnell wie NAD.

Zur Frage der Konfiguration

Wir sind so gut wie sicher, daß im synthetischen Ribosid **3a** und damit im Dinucleotid **9** die β -Konfiguration vorliegt, und zwar aus folgenden Gründen:

1. Nach mehreren z. B. in l.c.¹⁴⁾ aufgezählten Beobachtungen reagieren acylierte 1-Halogen-Zucker gleich welcher Konfiguration am C-1 bei der Glycosidierung stets unter *trans*-Eintritt des Rests zur benachbarten O-Gruppe. Baker und Mitarbb.¹⁴⁾ führen dies auf die intermediäre Stabilisierung des Carbonium-Ions durch die Acyloxy-Nachbargruppe zurück, wonach das Orthoester-Kation durch das Aglycon (A) von der Gegenseite angegriffen wird. Im Fall der 1-Chlor-tribenzoyl-ribofuranose dürfte die Reaktion zum β -O-Ribosid **2a** führen. Die Umlagerung zum *N*-Ribosid verläuft analog l.c.¹⁵⁾ ohne Konfigurationsänderung.



2. Im NMR-Spektrum von Glucosiden findet man beim Dublett des C-1'-Protons für α - und β -Anomere verschiedene Kopplungskonstanten ($J = \text{ca. } 3 \text{ bzw. } 7 \text{ Hz}$)¹⁶⁾. Wir haben die den Verbindungen **2a** und **3a** entsprechenden Tetraacetylglucoside **2b** und **3b** wie dort mit 2.3.4.6-Tetra-*O*-acetyl- α -glucopyranosylbromid und aus **3b** das freie Glucosid **4b** hergestellt und folgende NMR-Daten gewonnen: Das H^{1'}-Dublett von **2b**, **3b** und **4b** liegt bei 3.74, 3.66 und 3.66 ppm mit $J = 8, 9$ und 9 Hz . Daraus geht die β -Konfiguration hervor. Bei Ribosiden ist so keine eindeutige Entscheidung zu treffen¹⁷⁾, da der β -D-Ribofuranosylrest, je nachdem, ob er an einem Purin- oder Pyrimidinrest sitzt, verschiedene Konformationen einnehmen kann, so daß sich verschiedene Werte für den dihedralen Winkel zwischen H^{1'} und H^{2'} und somit für J ergeben. So fand man z. B. beim Uridin, das mit unserem „Deazapyrimidin“-ribosid vergleichbar ist, für das H^{1'}-Dublett $J = 2-3 \text{ Hz}$; der an **4a** gemessene Wert betrug bei einem scharfen Dublett (keine Anomerenmischung) bei 3.9 ppm ca. 1.5 Hz.

3. Nachdem bisher für die Glucoside **2b**, **3b** und **4b** die β -Verknüpfung bewiesen und für die Riboside **2a**, **3a** und **4a** nicht widerlegt war, ließen sich nun **4a** und **4b** durch Oxydation mit Perjodat miteinander in Beziehung setzen¹⁸⁾. Sie mußten dabei denselben Dialdehyd liefern, wenn sie zur β -Reihe gehörten, was identische Drehwerte gleichmolarer Oxydationslösungen verursachen sollte. Da bei Oxydation des Glucosids **4b** gegenüber **4a** ein Mol Ameisensäure entsteht unter Bildung eines zusätzlichen Mols Jodat, müssen vor dem Drehwertvergleich diese Komponenten in gleicher Menge dem Oxydationsansatz des Ribosids **4a** zugesetzt werden. In der Tabelle sind die Drehwerte beider Oxydationslösungen bei verschiedenen Wellenlängen verglichen.

Die Übereinstimmung der Werte ist gut genug, um die Identität der Abbaualdehyde und damit die β -Konfiguration von **4a** so gut wie zu sichern. Dazu kommt noch als weiteres Indiz das Auftreten eines doppelten positiven Cotton-Effekts in der ORD-Kurve von **4a**, was ebenfalls für die β -Konfiguration spricht^{15, 19)}.

¹⁴⁾ B. R. Baker, J. P. Joseph, R. E. Schaub und H. J. Williams, J. org. Chemistry **19**, 1786 (1954).

¹⁵⁾ G. Wagner und F. Sjöf, Arch. Pharmaz. **300**, 1027 (1967).

¹⁶⁾ R. U. Lemieux und J. W. Lown, Canad. J. Chem. **41**, 889 (1963).

¹⁷⁾ C. D. Jardetzky, J. Amer. chem. Soc. **82**, 229 (1960).

¹⁸⁾ J. Davall, B. Lythgoe und A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] **1946**, 833.

¹⁹⁾ Z. B. T. L. V. Ulbricht und G. T. Rogers, J. chem. Soc. [London] **1965**, 6125.

Vergleich der molaren Drehungen bei verschiedenen Wellenlängen der Perjodatoxydationslösungen von ca. 0.1 mMol *N*-Ribosid **4a***) und *N*-Glucosid **4b***)

| λ | $[M]_{\lambda}^{25^{\circ}}$ der Oxydationslösung von 4a | 4b |
|-----------|--|-----------|
| 365 | 937 | 827 |
| 405 | 610 | 503 |
| 436 | 481 | 387 |
| 546 | 259 | 218 |
| 578 | 224 | 186 |

*) 28 mg **4a** (1.03 mMol) bzw. 26 mg **4b** (0.87 mMol) wurden mit 0.5 ccm (bzw. 1.0 ccm) 0.25 *m* Na-Perjodatlösung in 2 ccm (bzw. 3 ccm) Wasser 24 Stdn. bei 20° aufbewahrt. Zum Ansatz von **4a** setzte man nach der Oxydation 1 ccm 0.1 *n* Ameisensäure und 29 mg NaJO₃ zu.

Das 6-Pyridon von NAD (**9**) wurde von Dr. *P. Knowles*, Nuffield, England, dem wir sehr dafür danken, auf Reduzierbarkeit zu NAD durch Mitochondrien aus Rattenleber und ihren Ultraschall-Partikeln geprüft. Dabei trat keine Reduktion, die bei einer Beteiligung an der oxydativen Phosphorylierung zu fordern wäre, ein.

Herr Dr. D. Orth hat der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Gewährung eines Forschungsstipendiums zu danken. Die ORD-Messung ist von Herrn Dr. *E. Besch* am Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M. ausgeführt worden.

Beschreibung der Versuche

3-Carbamoyl-pyridon-(6) (**1**): 14 g (ca. 0.1 Mol) *6-Hydroxy-nicotinsäure*⁶⁾ wurden unter Ausschluß von Feuchtigkeit in 200 ccm Dimethylformamid + 14.5 ccm *Triäthylamin* bei -15° unter starkem Rühren tropfenweise mit 9.5 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* versetzt und danach weitere 15 Min. bei dieser Temp. gerührt. Nach Entfernen der Außenkühlung wurden in einem Guß 200 ccm auf 0° gekühltes konz. *Ammoniak* zugegeben und bis zum Ende der CO₂-Entwicklung gerührt. Der Rückstand vom Abdampfen i. Vak. wurde mit 250 ccm Wasser heftig durchgeschüttelt und der hellgelbe flaumige Rückstand zuerst aus Dimethylformamid, dann aus Wasser umkristallisiert. Man erhielt 10 g (72%) farblose derbe Prismen vom Schmp. 325–327° (Zers.).

C₆H₆N₂O₂ (138.1) Ber. C 52.10 H 4.34 N 20.03 Gef. C 52.33 H 4.47 N 20.63

Das *Silbersalz* wurde durch Auflösen von 14.0 g des Amids **1** in 300 ccm heißem Wasser, Zufügen von 5 ccm 2*n* NaOH, dann von 150 ccm Äthanol und Eintropfen von 16.9 g *Silbernitrat* in 100 ccm Wasser ausgefällt. Der weiße voluminöse Niederschlag wurde nach Absitzen im Dunkeln abgesaugt und je 2mal mit Wasser, Äthanol und Aceton trockengesaugt. Die 20 g (80%) Ag-Salz wurden sofort weiterverarbeitet.

3-Carbamoyl-6-[2.3.5-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyloxy]-pyridin (**2a**): 5.0 g des vorher beschriebenen *Ag-Salzes* wurden in 150 ccm Toluol suspendiert und durch Abdestillieren von ca. 100 ccm Lösungsmittel azeotrop getrocknet. Zur Suspension gab man jetzt eine Lösung von 10.0 g *2.3.5-Tri-O-benzoyl-D-ribofuranosylchlorid*⁹⁾ in 60 ccm absol. Toluol und erhitzte unter starkem Rühren 30 Min. zum Sieden. Nach Filtrieren und Einengen des Filtrats und der Waschflüssigkeit auf 30 ccm kristallisierten über Nacht bei Raumtemp. 5.0 g (50%) des *O-Ribosids*, aus Essigester/Petroläther Schmp. 177°, $[\alpha]_{D}^{20}$: -24.3° (*c* = 1 in Chloroform).

C₃₂H₂₆N₂O₉ (582.2) Ber. C 65.96 H 4.50 N 4.81 Gef. C 65.84 H 4.66 N 4.78

3-Carbamoyl-6-[2.3.4.6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy]-pyridin (2b): Wie vorstehend erhielt man mit 8.5 g α -Acetobromglucose anstelle des Ribosederivats 7.5 g (80%) *O*-Glucosid; aus Essigester/Petroläther Schmp. 179°. $[\alpha]_{578}^{22}$: -17.0° ($c = 1$ in Chloroform).

$C_{20}H_{24}N_2O_{11}$ (468.4) Ber. C 51.28 H 5.13 N 5.98 Gef. C 51.26 H 5.46 N 5.81

3-Carbamoyl-pyridon-(6)-N¹-[2.3.5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosid] (3a): 2.4 g *O*-Ribosid **2a** wurden in 100 ccm Toluol mit 4 g $HgBr_2$ 3.5 Stdn. lang unter Rückfluß erhitzt. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden von der heißen Lösung abgesaugt und mit wenig kaltem Methanol gewaschen. Zu den so erhaltenen 1.3 g (50%) kamen noch 300 mg, die als schwerlöslicher Teil beim Behandeln des Eindampfrückstands mit Methanol hinterblieben. Umfällen aus Dimethylformamid/Wasser lieferte Kristalle vom Schmp. 232° (Zers.). $[\alpha]_{578}^{21}$: -28.0° ($c = 1$ in Dimethylformamid).

$C_{32}H_{26}N_2O_9$ (582.2) Ber. C 65.96 H 4.50 N 4.81 Gef. C 65.89 H 4.39 N 5.03

3-Carbamoyl-pyridon-(6)-N¹-[2.3.4.6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid] (3b): Aus 1.0 g des *O*-Glucosids **2b** erhielt man mit 2.0 g $HgBr_2$ wie bei **3a**, aber nach Abdampfen der klaren Lösung, Anreiben des schaumigen Rückstands mit Petroläther und Umfällen aus Chloroform/Petroläther 700 mg (70%) Kristalle vom Schmp. 216–217°. $[\alpha]_{578}^{23}$: $+75.0^\circ$ ($c = 0.99$ in Chloroform).

$C_{20}H_{24}N_2O_{11}$ (468.4) Ber. C 51.28 H 5.13 N 5.98 Gef. C 51.06 H 5.22 N 5.60

3-Carbamoyl-pyridon-(6)-N¹- β -D-ribofuranosid (4a): 1.8 g Tribenzoylverbindung **3a** wurden in 10 ccm 0.2 *m* methanol. Na-Methylat-Lösung 1 Min. zum Sieden erhitzt. Dann wurde durch Umschütteln mit methanol-feuchtem Dowex 50 (H⁺-Form) neutralisiert, vom Austauscher abfiltriert, mit Methanol gewaschen und die Methanollösung bei 15° i. Vak. bis zum Einsetzen der Kristallisation eingeeengt. Nach Aufbewahren im Kühlschrank über Nacht erhielt man 550 mg (~66%) des *Ribofuranosids*. Aus Isopropylalkohol Kristalle vom Schmp. 219–220°. R_F im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel HF₂₅₄) mit sek.-Butylalkohol/Ameisensäure/Wasser (75:15:10 Vol.) = 0.28. $[\alpha]_{578}^{25}$: $+71.4^\circ$ ($c = 0.98$ in Wasser).

$C_{11}H_{14}N_2O_6$ (270.1) Ber. C 48.87 H 5.22 N 10.38 Gef. C 48.74 H 5.13 N 10.42

3-Carbamoyl-pyridon-(6)-N¹- β -D-glucopyranosid (4b): 0.9 g Tetraacetylverbindung **3b** wurden in 55 ccm absol. Methanol + 6.5 ccm 0.2 *m* methanol. Na-Methylat-Lösung 1 Min. zum Sieden erhitzt und, wie voranstehend beschrieben, aufgearbeitet. Der ölige Abdampfrückstand kristallisierte beim Verreiben mit eiskaltem Methanol, von dem abgesaugt wurde. Aus Isopropylalkohol/Äthanol (9:1) 380 mg (66%), Schmp. 220–221°. $[\alpha]_{578}^{22}$: $+40.4^\circ$ ($c = 1.25$ in Wasser). R_F im System wie bei **4a**: 0.21.

$C_{12}H_{16}N_2O_7$ (300.3) Ber. C 42.95 H 5.36 N 9.38 Gef. C 42.53 H 5.59 N 9.10

3-Carbamoyl-pyridon-(6)-N¹-[2.3-O-isopropyliden- β -D-ribofuranosid] (5): 270 mg Ribosid **4a** wurden in 45 ccm Aceton mit 1.9 g *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat (10facher Überschuß) 1½ Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Zusatz von 50 ccm 0.5 *n* wäbr. NaHCO₃-Lösung wurde i. Vak. verdampft und der trockene Rückstand, staubfein gepulvert, in einer Soxhlet-Hülse mit absol. Benzol extrahiert. Der größte Teil der Isopropylidenverbindung schied sich schon aus den 60 ccm Benzol im Kolben beim Abkühlen kristallin aus, der Rest wurde durch Abdampfen der Mutterlauge gewonnen. Man erhielt 250 mg (87%), aus Benzol Schmp. 159–161°. R_F im obigen Lösungsmittel = 0.73. $[\alpha]_{578}^{22}$: $+28.2^\circ$ ($c = 0.75$ in Methanol).

$C_{14}H_{18}N_2O_6$ (310.2) Ber. C 54.17 H 5.85 N 9.03 Gef. C 53.83 H 5.71 N 9.17

3-Carbamoyl-pyridon-(6)-N¹-[β -D-ribofuranosid-5-phosphat] (8): 250 mg der Acetonverbindung **5** wurden in 10 ccm Pyridin mit 4 ccm der Stammlösung von 2-Cyan-äthylphosphat in Pyridin nach Tener¹¹⁾ bei 30° i. Vak. eingedampft. Nach 2maligem Nachdampfen mit

absol. Pyridin wurde in 10 ccm absol. Pyridin nach Auflösen von 2 g *DCC* 18 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt. Nach Zugabe von 20 ccm Wasser und 3stdg. heftigem Schütteln wurde vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und die wäbr. Lösung 2mal mit je 30 ccm Chloroform extrahiert. Nach Einengen der Wasserphase auf 2–3 ccm i. Vak. wurde auf eine 4×60 cm Säule von DEAE-Sephadex A-25 (Hydrogencarbonat-gesättigt) gegeben und mit Wasser eluiert, bis keine UV-absorbierende Substanz mehr austrat. Durch Elution mit Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung steigender Konzentration (von 0 bis 2.5% über 2.5 l) erhielt man eine UV-absorbierende Hauptfraktion (Uvicord), die man durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser i. Vak. vom Salz befreite. Man erhielt so 220 mg geschütztes *Mononucleotid* 6, dessen Cyanäthylgruppe und Isopropylidenrest folgendermaßen verseift wurde: Man ließ 220 mg 6 in 10 ccm 0.5 n *LiOH* 2 Stdn. bei Raumtemp. stehen und chromatographierte die filtrierte Lösung wie oben unter Gradientenelution mit einer Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung. Dabei trat im Eluat als Hauptfraktion zuerst das *Mononucleotid* 7, danach in kleiner Menge durch Hydrolyse der Carbonamidgruppe entstandenes 7' aus. Die Hauptfraktion wurde durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser vom Salz befreit und auf eine 4×35 cm Säule von Dowex 50 (H⁺-Form) gegeben und mit Wasser eluiert. Die als letzte austretende, die Hauptmenge enthaltende UV-absorbierende Fraktion wurde durch Eistrocknung isoliert. 83 mg 8 (ca. 30%) konnten durch Füllen mit Aceton aus der konzentrierten Lösung in Methanol als feines farbloses, dünn-schicht-chromatographisch und papierelektrophoretisch einheitliches Pulver erhalten werden. UV-Spektrum in Abbild. S. 199. *R_F* auf Kieselgel HF₂₅₄ in n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (6 : 3 : 1 Vol.) 0.36.

3-Carboxy-pyridon-(6)-N1-[β-D-ribofuranosid-5-phosphat] (8') entstand als Hauptprodukt, wenn die Abspaltung des Cyanäthylrests aus 250 mg 6 durch 1stdg. Erhitzen mit 0.5 n *LiOH* vorgenommen wurde. Die Chromatographie an DEAE-Sephadex A 25 im NH₄HCO₃-Gradienten ergab als dritte (Haupt-)Fraktion eine Verbindung, die durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser i. Vak. vom Salz befreit wurde. Nach saurer Hydrolyse an einer 4×35 cm Säule von Dowex 50 (H⁺-Form) erhielt man aus der ersten (Haupt-)Fraktion ein farbloses Pulver (150 mg, 54%). Ein Teil kristallisierte beim langsamen Verdunsten der wäbr. Lösung in farblosen Prismen. *R_F* (in obigem Gemisch) auf Kieselgel HF₂₅₄ 0.20.

C₁₁H₁₄NO₁₀P (351.2) Ber. C 37.61 H 4.04 N 3.93 Gef. C 37.62 H 4.07 N 3.98

Mit 50 mg 8' wurden nach der Anhydrid-Methode⁷⁾ in Dimethylformamid mit konz. Ammoniak analog Amid 1 (S. 202) etwa 50% eines *Amids* erhalten, das in jeder Weise mit Verbindung 8 identisch war.

3-Carbamoyl-pyridon-(6)-adenin-dinucleotid (9): 60 mg *Nucleotid* 8, die 1 Stde. über P₂O₅ bei 100°/0.1 Torr getrocknet waren, wurden in der Lösung von 90 mg auf gleiche Weise getrocknetem *N,N'*-Dicyclohexyl-guanidinium-Salz von Adenosin-monophosphorsäure-amid¹³⁾ in 10 ccm absol. Dimethylformamid + 10 ccm absol. Pyridin aufgelöst. Nach 10tägigem Stehenlassen im Dunkeln unter Feuchtigkeitsausschluß wurde bei möglichst niedrigem Druck abgedampft und der Rückstand in 3 ccm Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde auf eine 4×60 cm Säule von DEAE-Sephadex (Hydrogencarbonat-Form) aufgegeben, welche dann mit Wasser bis zum Verschwinden der UV-Absorption im Eluat gewaschen wurde. Sodann wurde mit Wasser/Ammoniumhydrogencarbonat, bis zur Konzentration 3% ansteigend, eluiert. Die erste Uvicord-registrierte Fraktion bestand aus unumgesetztem Amid-Salz, die zweite aus dem Dinucleotid 9, die dritte aus unverändertem Mononucleotid 8. Fraktion 2 wurde durch mehrmaliges Abdampfen i. Vak. vom Salz befreit und ergab nun 20 mg (17%) amorphes, farbloses Pulver. *R_F* auf Kieselgel im Propanol/Ammoniak-Gemisch von vorhin 0.47. UV-Spektrum siehe Abbild. S. 199.

3-Carboxy-pyridon-(6)-adenin-dinucleotid (9'): Carbodiimidverfahren: 100 mg des Nucleotids **8'** wurden zusammen mit 200 mg AMP in 10 ccm Wasser mit 50 ccm Pyridin und 2.5 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 20 Stdn. bei 20° filtrierte man vom Dicyclohexylharnstoff ab, gab weitere 2.5 g des Carbodiimids zu und wiederholte den Vorgang, bis insgesamt 12.5 g Carbodiimid verbraucht waren. Nach Zugabe von 25 ccm Wasser wurde 2 Stdn. später der Harnstoff abfiltriert und das Carbodiimid durch 2maliges Ausschütteln mit 50 ccm Chloroform entfernt. Die wäßr. Lösung wurde nach Einengen i. Vak. auf ca. 10 ccm auf eine 4 × 20 cm Säule von DEAE-Sephadex (Hydrogencarbonat-Form) gegeben und nach Auswaschen von UV-absorbierenden Substanzen mit Wasser in einem NH₄HCO₃-Gradienten bis zur Konzentration von 3% eluiert. Die vierte im Uvicord-Diagramm aufgezeichnete namhafte Fraktion im Elutionsvolumen von 700 bis 950 ccm enthielt das Dinucleotid **9'**, das nach mehrmaligem Abdampfen mit Wasser vom Salz befreit wurde. 30 mg (ca. 15%) einheitliches, amorphes Ammoniumsalz vom R_F 0.38 bei der Dünnschichtchromatographie im üblichen Lösungsmittel.

[312/68]