

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/026485

発行日 平成21年3月5日(2009.3.5)

(43) 国際公開日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 D 4 8 7 / 0 4	(2006.01)	C O 7 D 4 8 7 / 0 4	1 4 8	4 B O 2 4
C 1 2 N 1 5 / 0 9	(2006.01)	C 1 2 N 1 5 / 0 0	A	4 C O 5 0

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

出願番号	特願2007-533136 (P2007-533136)	(71) 出願人	504261077 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 東京都三鷹市大沢二丁目2 1 番 1 号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/314834	(74) 代理人	100110249 弁理士 下田 昭
(22) 国際出願日	平成18年7月27日(2006.7.27)	(74) 代理人	100113022 弁理士 赤尾 謙一郎
(31) 優先権主張番号	特願2005-248585 (P2005-248585)	(72) 発明者	片岡 正典 愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1 大学 共同利用機関法人自然科学研究機構 岡崎 共通施設内
(32) 優先日	平成17年8月30日(2005.8.30)	Fターム(参考)	4B024 AA20 BA80 CA20 HA20 4C050 AA01 BB08 CC08 EE04 FF01 GG03 HH01
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

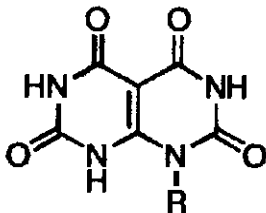
(54) 【発明の名称】 ユニバーサル塩基

(57) 【要約】

【課題】 相対する天然核酸塩基(A、T、C、G)を特異的に認識し塩基対を形成するという機能を全くもたず、4種のいずれの天然核酸塩基とも非特異的に塩基対を形成する人工核酸塩基を提供する。

【解決手段】 下式

【化1】



(式中、Rは、水素原子を除く、一価の基を表す。)で表され、4種の天然核酸塩基と非特異的に塩基対を形成することのできるユニバーサル塩基である。

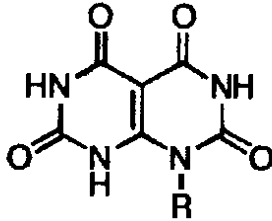
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下式

【化 1】



10

(式中、Rは、水素原子を除く、一価の基を表す。)で表され、4種の天然核酸塩基と非特異的に塩基対を形成することのできるユニバーサル塩基。

【請求項 2】

天然核酸塩基又は天然核酸塩基から成るオリゴヌクレオチドを含む溶液に請求項 1 に記載のユニバーサル塩基を混合することによりこれらの塩基対を形成させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、非特異的に4種の天然核酸塩基と塩基対を形成することのできる新規なユニバーサル塩基に関する。

20

【背景技術】

【0002】

天然核酸塩基と非特異的に擬似塩基対を形成する人工核酸塩基、即ちユニバーサル塩基を得る試みは多く成されている。しかし、一般にユニバーサル塩基と呼ばれているものはインターカレーターの類であり、これは天然核酸塩基と疑似塩基対を形成することはない。一方、疑似塩基対を形成するユニバーサル塩基としてイノシンをベースとした誘導体が知られているが(特許文献1、2等)、グアニンとしてのみふるまうことが最近の研究で明らかとなっている(非特許文献1)。

本発明において、発明者がユニバーサル塩基のベースとして利用したピリミド[4,5-d]ピリミジン-2,4,5,7-テトラオン及びその誘導体は、天然核酸塩基と疑似塩基対を形成するとは考えられていなかった(非特許文献2)。

30

【0003】

【特許文献 1】特表2005-511096

【特許文献 2】特表2003-528883

【非特許文献 1】Ohtsuka, E. et al., J. Biol. Chem., 260, 2605-2608(1985)

【非特許文献 2】Niess, R., Robins, R. K. J. Heterocyclic. Chem., 7, 243-244(1970)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、相対する天然核酸塩基(A、T、C、G)を特異的に認識し塩基対を形成するという機能を全く持たず、4種のいずれの天然核酸塩基とも非特異的に塩基対を形成する人工核酸塩基を提供することを目的とする。

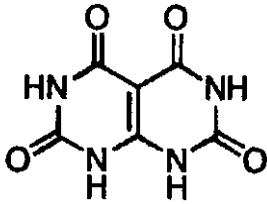
40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、ピリミド[4,5-d]ピリミジン-2,4,5,7-テトラオン(下式)

【化 2】



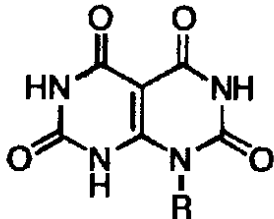
に注目した。この無置換のピリミド[4,5-d]ピリミジン-2,4,5,7-テトラオンは水や有機溶媒に対する溶解度が極めて低く、通常天然核酸塩基と塩基対を形成する場合は溶液状態であるため、目的とする塩基対形成機能を実現することができない。そこで、発明者らは、この1位に水素原子以外のアルキル基等を導入したところ、水や有機溶媒に対する溶解度が上がり、実際に天然核酸塩基と塩基対を形成するための溶液中の濃度程度に溶解することを見出し、更に、4種の天然核酸塩基との塩基対形成試験を行ったところ、当該化合物が4種のいずれの天然核酸塩基とも非特異的に塩基対を形成することを見出し、本発明を完成するに至った。

10

【0006】

即ち、本発明は、下式

【化 1】



20

(式中、Rは、水素原子を除く、一価の基を表す。)で表され、4種の天然核酸塩基と非特異的に塩基対を形成することのできるユニバーサル塩基である。

また本発明は、天然核酸塩基又は天然核酸塩基から成るオリゴヌクレオチドを含む溶液に上記ユニバーサル塩基を混合することによりこれらの塩基対を形成させる方法である。

30

【発明の効果】

【0007】

本発明のユニバーサル塩基は、従来ユニバーサル塩基と称されてきた化合物とは構造が全く異なる新規な化合物である。このユニバーサル塩基は、相対する塩基に呼応して動的に構造を変化させることにより疑似塩基対を形成する。

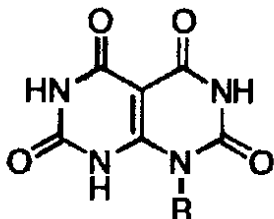
【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明のユニバーサル塩基は、ピリミド[4,5-d]ピリミジン-2,4,5,7-テトラオン(化1)の1位の窒素原子に置換基を有する構造を持ち、下式で表される。

40

【化 1】



式中、Rは、水素原子を除く一価の基であれば如何なるものでもよい。塩基対を形成しようとする天然核酸塩基又は天然核酸塩基から成るオリゴヌクレオチドを含む溶液に塩基対を形成するために必要な濃度で溶解し、塩基対形成に支障のないことが好ましい。

【0009】

50

このようなRとして、例えば、ヘテロ原子（S，O，Nなど）を含んでもよい炭化水素基、例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、複素環基などであってもよいし、タンパク質やペプチド断片、天然核酸や他の人工核酸、スチレンビーズ等の合成ポリマー等であってもよい。また、これらに反応基や発色団などの各種マーカを付してもよい。

また、例えば、PCR法における配列未特定遺伝子や不特定遺伝子のクローニングを行う場合、ヒトゲノム中の一塩基多型の検出を行う場合には、又はアンチジーン法による不特定遺伝子の発現抑制を行う場合には、Rは天然又は非天然のオリゴヌクレオチド鎖が好ましい。核酸成分の高選択的抽出や除去をなどを行う場合には、Rは水溶性官能基、例えば、水酸基、チオール基、カルボキシル基、アミド基又はアミジン基等を有するアルキル基などが好ましい。ヌクレオチド成分の選択的除去や抽出を行う場合には、Rは脂溶性官能基、例えば、炭素数が5以上のアルキル基又はシロキシ基、エステル基、アリール基などを含むアルキル基などが好ましい。

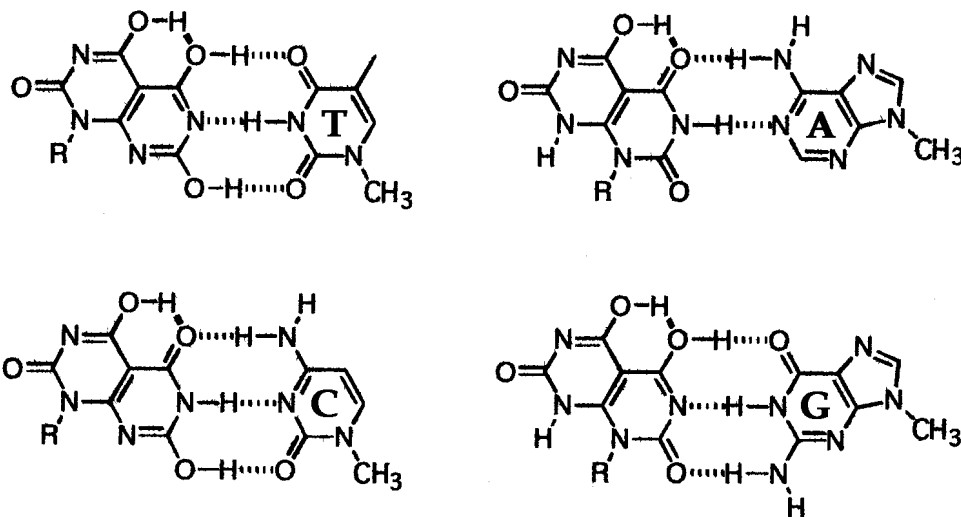
10

【0010】

本発明のユニバーサル塩基は、その結合を軸とした回転により、プリン型、ピリミジン型の両塩基になりうる。即ち、本発明のユニバーサル塩基は、下式に示すように、相対する塩基がアミジン型の塩基であるアデニン（A）又はシトシン（C）の場合はアミド型の配置、アミド型塩基であるグアニン（G）又はチミン（T）の場合はアミジン型配置をとり、すべての天然核酸塩基と塩基対を形成することができる。

20

【化3】



30

本発明のユニバーサル塩基を天然核酸塩基と塩基対を形成させる場合に用いる溶媒は、一般的には非プロトン性有機溶媒が好ましいが、DNAの溶解度や、生体内で使うことを想定した場合には緩衝液、オリゴヌクレオチドの合成や利用を考えた場合は水やアルコール、ヌクレオチドの吸着を考えた場合にはDMSOやDMFが好ましい。この塩基対形成においてはユニバーサル塩基や天然核酸塩基の濃度は通常1mM程度である。

40

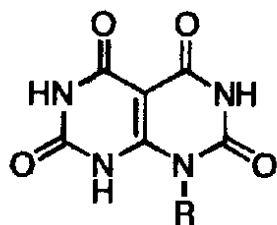
以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

【0011】

本実施例では、下式

【化1】



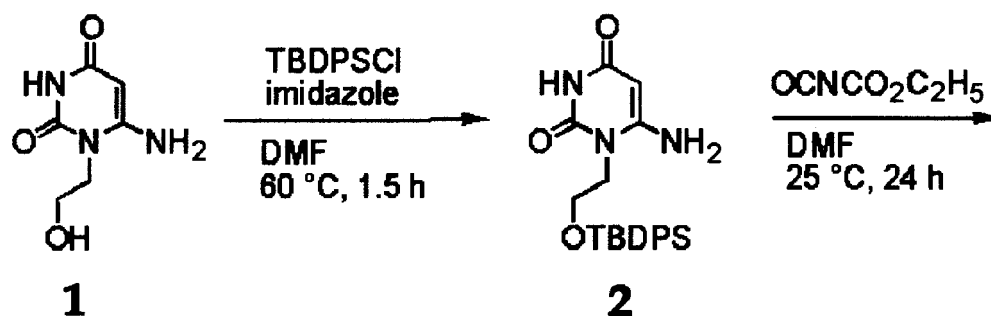
(式中、Rは、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OTBDPS}$ を表す。)で表されるピリミド[4,5-d]ピリミジン-2,4,5,7-テトラオン誘導体(以下「PPT」という。)を合成した。

10

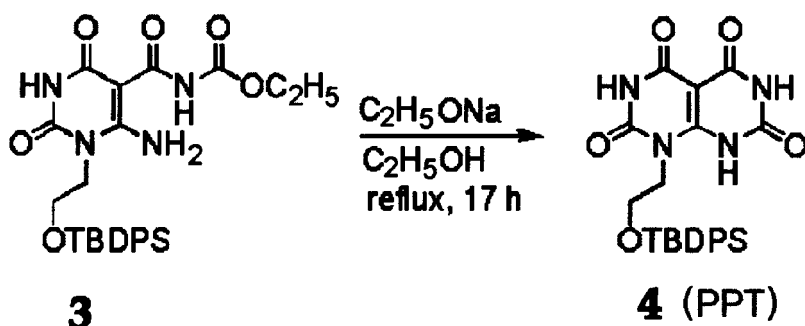
【0012】

反応スキームを下式に示す。

【化4】



20



30

【0013】

1-ヒドロキシエチル-6-アミノウラシル(化合物1)の合成

フッ素樹脂コートした撹拌子を備えた200 mLナス型フラスコに、無水エタノール90 mLを加え氷浴中撹拌しながら金属ナトリウム2.8 g(120mmol)を注意深く加え、完全に溶解するまで撹拌した。その後、2-ヒドロキシエチル尿素6.3 g(60mmol)とシアノ酢酸エチル6.4 mL(60mmol)を加え、7時間還流させた。得られた反応溶液をろ過した後、エタノールで洗い、水に溶解させて1.0 M希塩酸で中和した後にろ過をし、得られる白色固体を水で再結晶させることにより、白色結晶として化合物1を得た(6.1g, 35.6mmol、収率59.4%)；¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) : 3.54 (t, 2H, NCH₂CH₂, 9.6 Hz), 3.83 (t, 2H, CH₂OH, 9.6 Hz), 4.57(br, 1H, CHCNH₂), 5.09 (br, 1H, OH), 6.61 (br, 2H, NH₂), 10.32 (br, 1H, NH)；¹³C NMR (DMSO-d₆, 100MHz) : 44.13 (NaC₂H₅), 59.28 (CH₂OH), 76.52 (CHCNH₂), 151.87, 157.04, 162.89。

40

【0014】

1-(2-t-ブチルジフェニルシリロキシ)エチル-6-アミノウラシル(化合物2)の合成

フッ素樹脂コートした撹拌子を備えた50 mLナス型フラスコに、上記で得た化合物1を1.0 g(5.8 mmol), t-ブチルジフェニルクロロシラン(東京化成製、1.7 mL, 6.4 mmol), イミダゾール(ナカライ製、875 mg, 12.8 mmol), ジメチルホルムアミド(キシダ製)6 mLを加え、60 °Cで1.5時間反応させた後、撹拌している水1 L中に、パスツールピペットを

50

用いてゆっくり滴下した。しばらく攪拌した後、ろ過し、乾燥させることにより、白色固体として化合物 2 を得た (2.2 g, 5.4 mmol, 収率92.0%)。

^1H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 0.96 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.76 (br, 2H, NCH₂), 4.04 (br, 2H, CH₂OH), 4.60 (br, 1H, CHCNH₂), 6.70 (br, 2H, NH₂), 7.41 (m, 6H), 7.58 (m, 4H), 10.32 (br, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 19.11 (SiC(CH₃)₃), 26.92 (SiC(CH₃)₃), 42.06 (NCH₂CH₂), 61.55 (NCH₂CH₂), 76.15 (CHCNH₂), 127.96, 128.33, 130.33, 130.08, 134.94, 135.48, 151.85, 158.75, 162.94

【0015】

(6-アミノ-1-[2-(*t*-ブチルジフェニルシラニロキシ)-エチル]-2,4-ジオキソ-1,2,3,4-テトラヒドロピリミジン-5-カルボニル)カルバミン酸エチルエステル(化合物3)の合成

フッ素樹脂コートした攪拌子を備えた 100 mL ナス型フラスコに、上記で得た化合物 2 を13.7 g (33.3 mmol)とジメチルホルムアミド(40 mL)を加え、室温下で攪拌しながら滴下漏斗でイソシアナトギ酸エチル3.9 g (東京化成製、33.9 mmol)を30分かけて滴下した。その後、室温で24時間攪拌し、減圧濃縮し、減圧乾燥させ、酢酸エチルで洗浄することにより白色固体として化合物 3 を得た (7.0 g, 13.3 mmol, 収率40.1%)。

^1H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 0.94 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 1.22 (t, 3H, OCH₂CH₃, 7.2 Hz), 3.81 (br, 2H, NCH₂, 4.8 Hz), 4.12 (q, 2H, OCH₂CH₃, 4.8 Hz), 4.18 (t, 2H, NCH₂CH₂, 4.8 Hz), 7.42 (m, 6H), 7.53 (m, 4H), 8.36 (br, 1H), 10.85 (br, 1H), 11.35 (br, 1H), 12.39 (br, 1H); ^{13}C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 14.68 (OCH₂CH₃), 19.05 (SiC(CH₃)₃), 26.89 (SiC(CH₃)₃), 43.12 (NCH₂), 60.61 (OCH₂CH₃), 61.12 (NCH₂CH₂), 81.06 (COCCO), 128.30, 130.39, 132.94, 135.42, 148.77, 150.77, 159.94, 164.45, 166.23

【0016】

1-[2-(*t*-ブチルジフェニルシラニロキシ)-エチル]-1H,8H-ピリミド[4,5-*d*]ピリミジン-2,4,5,7-テトラオン(化合物4)の合成

フッ素樹脂コートした攪拌子を備えた50 mLナス型フラスコに、無水エタノール(ナカライ製)20 mLを加え氷浴中攪拌しながら金属ナトリウム60 mg(ナカライ製、2.6 mmol)を注意深く加え、完全に溶解するまで攪拌した。その後、上記で得た化合物 3 を600 mg (1.1 mmol)を加え、17時間還流させた。得られた反応溶液をろ過することにより得られる固体を1.0 M希塩酸で洗い、減圧乾燥させることにより、白色固体として化合物 4 (PPT)を得た (500 mg, 1.0 mmol, 収率91.6%)。

^1H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 0.94 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 3.83 (t, 2H, NCH₂CH₂), 4.23 (t, 2H, NCH₂CH₂), 7.38 (m, 6H), 7.57 (m, 4H), 9.79 (br, 1H), 10.53 (br, 1H); ^{13}C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 19.16 (SiC(CH₃)₃), 27.03 (SiC(CH₃)₃), 42.27 (NCH₂), 61.12 (NCH₂CH₂), 86.04 (COCCO), 128.26, 130.14, 133.56, 135.43, 151.56, 157.86, 161.62, 162.60, 164.78; MS (ESI+) 479.21 (M +H+ calcd 479.17)

【実施例2】

【0017】

本実施例では、実施例1で得たPPTの溶解度を調べた。比較のため、R = Hのもの(以下「PPT(H)」という。)に溶解度を調べた。

溶解試験は、表1に示す各溶媒を用い、溶質の濃度を1~100mMとし、該当濃度において、一度50℃まで昇温した後、27℃まで冷却し、不溶物が残った場合「不溶」とし、残らない場合「可溶」とした。緩衝液の濃度は100mM、pHは7.0とした。

結果を下表に示す。

10

20

30

40

【表 1】

R 濃度 溶媒	H		CH ₂ CH=CH ₂		CH ₂ CH ₂ OH		CH ₂ CH ₂ OTBDPS		CH ₂ COOH	
	1mM	100mM	1mM	100mM	1mM	100mM	1mM	100mM	1mM	100mM
水	不溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶	可溶	可溶
リン酸緩衝液	不溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶	可溶	可溶
TBE緩衝液	不溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶	可溶	可溶
メタノール	不溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶	可溶	不溶
DMSO	不溶	不溶	可溶	可溶	可溶	不溶	可溶	可溶	可溶	不溶
DMF	不溶	不溶	可溶	可溶	可溶	不溶	可溶	可溶	可溶	不溶

10

PPT(H)は水及び各種有機溶媒に対して全く溶解しない。しかし、1-アルキル置換体は単純なメチル、エチル、アリルであっても100 μ M以上の溶解性を示す。水溶液に対する溶解度の向上は複素官能基化された炭素数1以上のアルキル置換基の導入で顕著となり、有機溶媒に対する溶解度の向上は1位窒素原子への炭素数3以上のアルキル基の導入あるいはトリアルキルシロキシ基の導入で顕著となる。

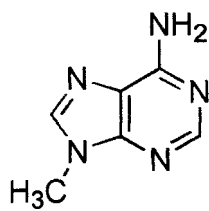
【実施例 3】

20

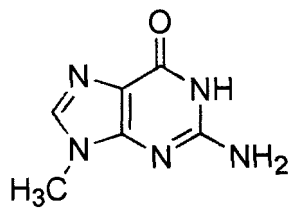
【0018】

本実施例では、PPTと4種の天然核酸塩基との間の疑似塩基対形成を調べた。
この試験のために下式

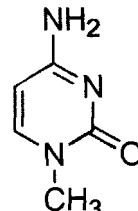
【化 5】



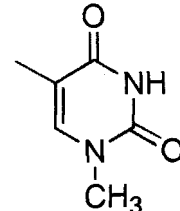
9-メチルアデニン (A)



9-メチルグアニン (G)



1-メチルシトシン (C)



1-メチルチミン (T)

30

の天然核酸塩基を用いた。これらの合成法は後述の合成例 1 に示す。それぞれ 1 位又は 9 位で塩基対形成をしないように、Nメチル化を行った。

【0019】

塩基対形成試験は以下の通りおこなった。

PPTと各N-メチル化天然核酸塩基(1-メチルシトシン(以下「C」という。)、1-メチルチミン(以下「T」という。)、9-メチルアデニン(以下「A」という。)、9-メチルグアニン(以下「G」という。))との混合物の濃度を一定(7.5mmol/l)に保ちつつ、混合比(モル比)を0:10~10:0に変化させて、25において無水ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させた。このDMSOは凍結脱気法によって酸素が除去されアルゴンが溶解している無水ジメチルスルホキシドであって、あらかじめ作成しておいた基質のDMSO溶液を混合して一晩(12時間)放置したものを用いた。

40

その後、紫外領域の吸光度変化を下記の条件で測定した。

- 測定装置 JASCO V-550 SERIAL NO. C02951260
- 温度コントローラー JASCO PSC-498T
- セル GL Science Type : AB20-SQ-0.1 (光路長 0.1mm)
- セルアダプター CAS-10-1
- 測定波長 : 200~350nm

【0020】

50

吸光度変化を図 1 に示す。吸光度は混合比に比例して変化することがわかる。

この吸光度が変化した波長における吸光度を混合比に対してプロットしたものを図 2 に示す。

基質同士の相互作用が無い場合に基質の吸収スペクトルの吸光度が混合比に比例する (Beer's 則) が、Beer's 則の定める直線から逸脱した場合には、基質同士の相互作用の存在が示唆される。

図 2 に示すように、PPT と 4 種の天然核酸塩基とのいずれの混合溶液においても大きな逸脱が観測され、PPT と各天然核酸塩基が塩基対を形成し、Beer's 則の定める直線から逸脱したものと考えられる。

【 0 0 2 1 】

比較例 1

比較のため、A - T 及び G - T について、実施例 3 と同様に塩基対形成試験をおこなった。結果を図 3 と 4 に示す。A - T の場合には、塩基対形成による Beer's 則の直線からの逸脱が観察されたが、G - T の場合には、塩基対が形成されず Beer's 則の直線から逸脱していないことが観察された。

【 0 0 2 2 】

合成例 1

(1) 1-メチルシトシンの合成

磁気攪拌子を備えた 100mL ナスフラスコに、シトシン (3.0g, 27mmol)、ジメチルホルムアミドジメチルアセタール (40mL) を加え、攪拌しながら 120 に加熱した。その後、トリフルオロ酢酸 (0.2mL) を加え 18 時間攪拌した。反応溶液を室温まで冷ました後、氷浴で冷却した。析出した白色沈殿をろ取り、ジクロロメタン、エタノールに溶解させヘキサンより粉体化を行った。個体を集め真空乾燥を行うことで 4-N-(N,N-ジメチルアミノメチレン)-1-メチルシトシンを 3.6g 収率 74% の白色個体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)

磁気攪拌子を備えた 100mL ナスフラスコに 4-N-(N,N-ジメチルアミノメチレン)-1-メチルシトシン (1.0g, 5.5mmol)、メチルアミン 30% エタノール溶液 (50mL) を加え 12 時間攪拌した。析出した白色個体を集めエタノール-水より再結晶化を行うことで、目的物を 0.61g 収率 88% の白色個体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 3.31(s, 3H), 5.59(d, 1H), 6.91(br, 2H), 7.54(d, 1H) ¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): 36.6, 92.9, 146.6, 156.3, 166.1; MS(ESI+) calcd for C₅H₇N₃O+(M+H+) 126.0662, found 126.0804.

【 0 0 2 3 】

(2) 1-メチルチミンの合成

磁気攪拌子を備えた 100mL ナスフラスコに、チミン (2.0g, 16mmol)、ヘキサメチルジシラザン (32mL)、トリメチルシリルクロリド (4.1mL) を加え 140 で反応液が透明になるまで 17 時間攪拌した。反応溶液を 60 まで冷ました後、ヨウ化メチル (10mL) を加え、60 で 29 時間攪拌した。反応溶液に 6N 酢酸水溶液 (6mL × 10) を加え、反応溶液を減圧下留去し、残渣に 2-プロパノールを加え不溶物をろ取した。これをエタノール-水より再結晶化を行い、目的物を 1.6g 収率 72 % の白色固体として得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1.73(d, 3H), 3.18(d, 3H), 7.49(t, 1H), 11.19(br, 1H) ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 11.9, 34.9, 108.1, 142.3, 151.2, 164.4; MS(ESI+) calcd for C₆H₈N₂O₂+(M+H+) 141.0608, found 141.0669.

【 0 0 2 4 】

(3) 9-メチルアデニンの合成

磁気攪拌子を備えた 300mL ナスフラスコに、アデニン (2.0g, 14.8mmol), テトラヒドロフラン (100mL), テトラブチルアンモニウムフルオリド 1.0M テトラヒドロフラン溶液 (37mL, 37mmol) を加え攪拌中、ヨウ化メチル (2.72mL) を 10 分かけて滴下し 2.5 時間攪拌した。反応溶液を減圧下留去し、残渣にメタノールを加え不溶物をろ取した。これをエタノール-水より再結晶化を行い、目的物を 1.0g 収率 45% の白色個体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 3.70(s, 3H), 7.15(br, 2H), 8.07(s, 1H), 8.13(s, 1H) ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 29.3, 118.6, 141.3, 149.8, 152.4, 155.9; MS(ESI+) calcd for C₆H₇N

10

20

30

40

50

m/z 5+(M+H)⁺150.0774, found 150.0914

【 0 0 2 5 】

(4) 9-メチルグアニンの合成

2-アミノ-6-クロロ-9-メチルプリンを出発物質とし、メチル基を文献に従って導入した。その際、文献記載のカラムによる精製は行わず次の段階へ進行した。

磁気攪拌子を用いた 100mL ナスフラスコにベンジルアルコール(40mL)、金属ナトリウム(760mg, 23.5mmol)を加え 1 時間室温で攪拌した。そこへ、2-アミノ-6-クロロ-9-メチルプリン(1.98g, 7.8mmol)を加え 70 °C で 48 時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル-水で分液し、水槽を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム乾燥を行い、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ- (ヘキサン：酢酸エチル=1：1、酢酸エチル：メタノール=9：1) で精製を行うことにより6-O-ベンジル-9-メチルグアニンを 1.2g 合計収率 26 %の白色個体として得た。¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): 3.58(s, 3H), 5.48(s, 2H), 6.44(br, 2H), 7.33ミ7.49(m, 5H), 7.81(s, 1H)

磁気攪拌子を備えた 100mL ナスフラスコに、6-O-ベンジル-9-メチルグアニン(1.48g, mmol)、ジクロロメタン(20mL)、トリフルオロ酢酸(10mL)を加え室温で 12 時間攪拌した。反応溶液を留去し、残渣をメタノールで共沸した。残渣をエタノールに溶解させたのち、ヘキサンで粉体化を行い固体を集め、エタノール-水より再結晶化を行い、目的物を 0.7g 収率 75 %の白色固体として得た。

¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): 3.51(s, 1H), 6.40(br, 2H), 7.61(s, 1H), 10.49(br, 1H)

¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆): 29.2, 116.5, 138.0, 151.5, 153.5, 156.8;MS(ESI+)calcd for C₆H₇N₅O⁺(M+H)⁺166.0723, found 166.0860.

【産業上の利用可能性】

【 0 0 2 6 】

本発明のユニバーサル塩基は、PCR法における配列未特定遺伝子や不特定遺伝子のクローニング、ヒトゲノム中の一塩基多型の検出、アンチジーン法による不特定遺伝子の発現抑制、核酸成分の高選択的抽出・除去などに応用できる。これらの場合、用途に応じて、このユニバーサル塩基を他の人工核酸へ導入することや、その他の生体様物質への導入、ポリスチレンビーズへの担持などをおこなってもよい。また、このユニバーサル塩基単体をヌクレオチド成分の選択的除去や抽出に利用することもできる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 7 】

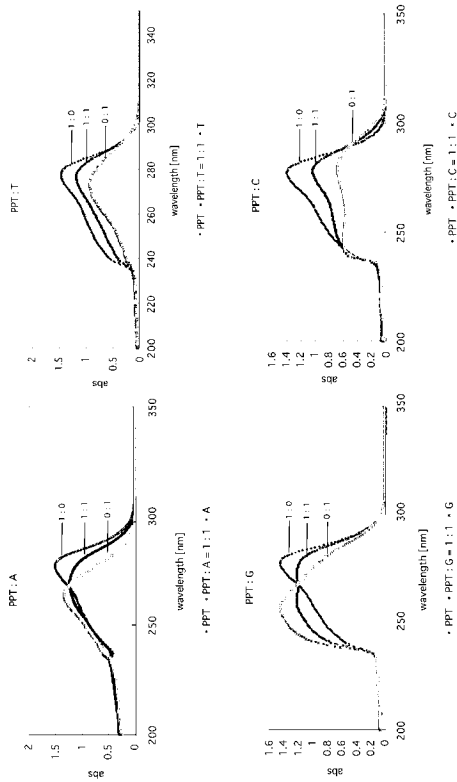
【図 1】本発明のユニバーサル塩基 (P P T) と 4 種の天然核酸塩基との混合物の吸光度変化を示す図である。

【図 2】図 1 の吸光度を混合比に対してプロットした図である。

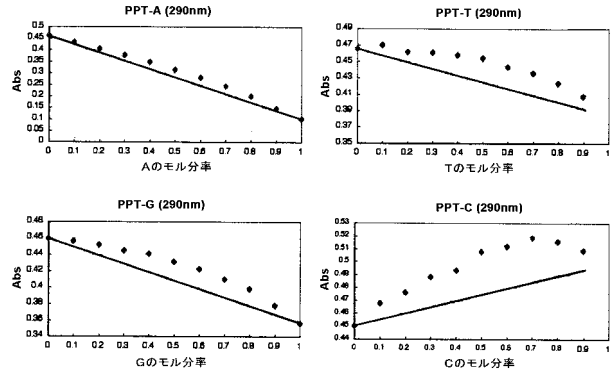
【図 3】A - T 及び G - T の混合物の吸光度変化を示す図である。

【図 4】図 3 の吸光度を混合比に対してプロットした図である。

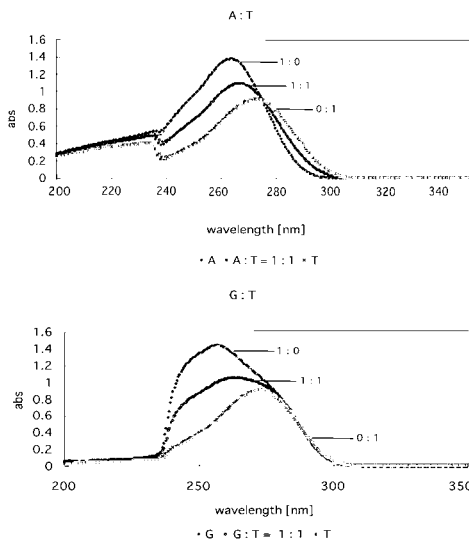
【 図 1 】



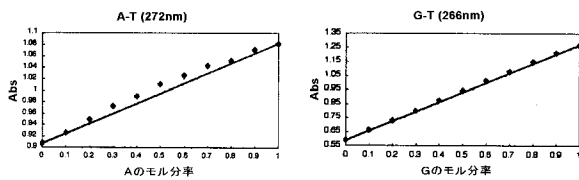
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/314834
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07F7/18(2006.01)i, C07H21/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07F7/18, C07H21/04, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-528883 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 30 September, 2003 (30.09.03), & US 2004/171820 A1 & EP 1138688 A1 & WO 01/72764 A1	1-2
A	LOAKES, David et al., Synthesis and some biochemical properties of a novel 5,6,7,8- tetrahydropyrimido[4,5-c]pyridazine nucleoside, Helvetica Chimica Acta, 2003, 86(4), 1193-1204	1-2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 October, 2006 (05.10.06)		Date of mailing of the international search report 17 October, 2006 (17.10.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314834

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HE, Junlin et al., Base pairing of 8-aza-7-deazapurine-2,6-diamine linked via the N(8)-position to the DNA backbone: universal base-pairing properties and formation of highly stable duplexes when alternating with dT, Helvetica Chimica Acta, 2002, 85(5), 1340-1354	1-2

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/314834													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07F7/18(2006.01)i, C07H21/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07F7/18, C07H21/04, C12N15/09															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2006年														
日本国実用新案登録公報	1996-2006年														
日本国登録実用新案公報	1994-2006年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN) REGISTRY (STN)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号													
A	JP 2003-528883 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー) 2003.09.30 & US 2004/171820 A1 & EP 1138688 A1 & WO 01/72764 A1	1-2													
A	LOAKES, David et al., Synthesis and some biochemical properties of a novel 5,6,7,8- tetrahydropyrimido[4,5-c]pyridazine nucleoside, Helvetica Chimica Acta, 2003, 86(4), 1193-1204	1-2													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。													
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 05.10.2006		国際調査報告の発送日 17.10.2006													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 井上 千弥子	4H 9356												
		電話番号 03-3581-1101 内線	3443												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 4 8 3 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HE, Junlin et al., Base pairing of 8-aza-7-deazapurine-2,6-diamine linked via the N(8)-position to the DNA backbone: universal base-pairing properties and formation of highly stable duplexes when alternating with dT, Helvetica Chimica Acta, 2002, 85(5), 1340-1354	1 - 2

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。