

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-296832

(P2005-296832A)

(43) 公開日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl.⁷

B01J 19/00

F I

B01J 19/00 321

テーマコード (参考)

4G075

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-117682 (P2004-117682)

(22) 出願日 平成16年4月13日 (2004.4.13)

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都港区芝五丁目33番8号

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス

(72) 発明者 加養 篤志

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
株式会社三菱化学科学技術研究センター内

(72) 発明者 越畑 雅信

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
株式会社三菱化学科学技術研究センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固相自動合成装置

(57) 【要約】

【課題】 固相合成を迅速に行い、固相を迅速に洗浄し、固相を迅速に乾燥することを同時に達成し、固相自動化装置において合成や洗浄に費やす時間を短縮すること。

【解決手段】 合成反応を行うための複数の反応試薬及び溶媒の保管容器、該反応試薬及び溶媒を微小管状反応管に供給するための配管、該反応試薬及び溶媒を微小管状反応器に供給させるための送液手段、微小管状反応器に所望の反応試薬及び溶媒だけを供給させるための切り替えバルブ、並びに反応基質固定化用担体が充填された微小管状反応器を含む固相自動合成装置であって、前記微小管状反応器内に必要量の反応試薬を送液後、送液を停止した状態で所望の合成反応を行わせ、反応終了後、担体に固定化された反応物以外の反応試薬を溶媒にて洗浄除去できる機能を有することを特徴とする固相自動合成装置。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

合成反応を行うための複数の反応試薬及び溶媒の保管容器、該反応試薬及び溶媒を微小管状反応管に供給するための配管、該反応試薬及び溶媒を微小管状反応器に供給させるための送液手段、微小管状反応器に所望の反応試薬及び溶媒だけを供給させるための切り替えバルブ、並びに反応基質固定化用担体が充填された微小管状反応器を含む固相自動合成装置であって、前記微小管状反応器内に必要量の反応試薬を送液後、送液を停止した状態で所望の合成反応を行わせ、反応終了後、担体に固定化された反応物以外の反応試薬を溶媒にて洗浄除去できる機能を有することを特徴とする固相自動合成装置。

【請求項 2】

微小管状反応器の内径が 0.1 ~ 10 cm であり、容量が 0.5 ~ 10 ml である、請求項 1 に記載の固相自動合成装置。

【請求項 3】

反応基質固定化用担体が樹脂である、請求項 1 又は 2 に記載の固相自動合成装置。

【請求項 4】

反応試薬の必要量が反応管に充填された樹脂の膨潤相当量である、請求項 3 に記載の固相自動合成装置。

【請求項 5】

樹脂の膨潤が終了したことを液面センサーで検知して、送液を自動的に停止する機構を有する、請求項 3 又は 4 に記載の固相自動合成装置。

【請求項 6】

樹脂の粒子径が、膨潤状態で 2 ~ 500 ミクロンである、請求項 3 から 5 のいずれかに記載の固相自動合成装置。

【請求項 7】

多糖類合成用である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の固相自動合成装置。

【請求項 8】

N 個の配列された試薬及び溶媒容器群と、M 個の配列された微小管状反応器群を含み、該試薬及び溶媒容器群と該微小管状反応器群との間に配置される切り替えバルブ群に関して、試薬及び溶媒容器群に接続される M 方切り替えバルブ群と微小管状反応器群に接続される N 方切り替えバルブ群（ここで、M は 2 ~ 20 の整数であり、N は 2 ~ 20 の整数である）を備えている、請求項 1 から 7 の何れかに記載の固相自動合成装置。

【請求項 9】

M 個の微小管状反応器が直列に接続されている、請求項 8 に記載の固相自動合成装置。

【請求項 10】

微小管状反応器の温度を調節するための温度調節部をさらに有し、該温度調節部が、初期温度と、終期温度と、初期温度と終期温度との間の昇温速度とを設定制御できる機能を有する、請求項 1 から 9 の何れかに記載の固相自動合成装置。

【請求項 11】

以下の A ブロック ~ H ブロックから構成される、請求項 1 から 10 の何れかに記載の固相自動合成装置。

(A) ガス容器 B 1 の不活性ガスを用いて送液操作を行う流量計 MF 1 と乾燥操作を行う流量計 MF 2 を備え、3 方切り替えバルブ V 1 3 により、乾燥操作か送液操作かが選択される A ブロック；

(B) 溶媒容器 B 2 と溶媒容器 B 3 からの極性溶媒及び無極性溶媒を用いて洗浄操作を行うためのポンプ P 1 とポンプ P 2 を備える、B ブロック；

(C) X 個 (X は 2 ~ 17 の整数を示す) の反應用の試薬ボトル B 4 から B Y (ここで、Y は X + 3 で表される整数を示す) の試薬を吸引して送液する操作を行うシリンジポンプ S 4 から S Y を備え、吸引か送液かを選択するために X 個の 3 方切り替えバルブ V 1 4 から V Z (Z = X + 13 で表される整数を示す) を備える、C ブロック；

(D) A ブロックの不活性ガス、B ブロックの洗浄溶媒、C ブロックの X 個の試薬群を

10

20

30

40

50

複数の反応容器に配分するための切り替え Y 個のバルブ群 V 1 から V Y を備える、D ブロック；

(E) A ブロックの不活性ガス、B ブロックの洗浄溶媒、C ブロックの X 個の試薬群をそれぞれ所定の M 個 (M は 2 ~ 2 0 の整数を示す) の反応容器に供給するための M 個の切り替えバルブと、反応器をバイパスして上流のバルブ群を乾燥したい場合に使用する M 個の 3 方切り替えバルブを備える、ブロック E ；

(F) 固相であるレジジン粒子を充填した M 個の反応容器をブロックに固定保持した部分と温度センサーと液面センサーとを備える、ブロック F ；

(G) M 個の反応容器を通液した溶媒及び各種の試薬液を回収するトラップと切り出した生成液を回収する M 個の回収ボトルを備える、ブロック G ；及び

(H) A ブロックから G ブロックの流量制御、バルブ制御、温度制御及び液面制御を行うための手段を備える、H ブロック。

10

【請求項 1 2】

M 個の反応容器を同時に溶媒洗浄でき、また M 個の反応容器を同時に乾燥することができるように、A ブロックと B ブロックと E ブロックにさらに追加の 3 方切り替えバルブが備えられている、請求項 1 1 に記載の固相自動合成装置。

【請求項 1 3】

請求項 1 から 1 2 の何れかに記載の固相自動合成装置を用いて、固相自動合成を行う方法。

【請求項 1 4】

反応試薬及び溶媒の送液を、不活性ガスを用いて圧送することにより行う、請求項 1 3 に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

極性溶媒と無極性溶媒を併用して洗浄を行う、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、目的化合物を自動的に合成する複数個の試薬や溶媒容器と複数個の反応容器から構成される自動合成装置及びそれを用いた固相自動合成方法に関する。特に、本発明は、固相合成において目的生成物を取得する際に、過剰の試薬や溶媒が発生する無駄を抑制し、合成や洗浄の際に攪拌混合を行う動力装置を備えずに、試薬の拡散混合時間や合成反応時間や固相の洗浄時間を著しく短縮した、固相自動合成装置及びそれを用いた固相自動合成方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

製薬、バイオサイエンス又は化学などの研究分野において用いられている従来の自動合成装置は、合成反応をおこなう複数個の配列された反応容器を備えており、各反応器内に試薬や溶媒などをそれぞれ分注または送液するとともに、各反応器を冷却または加熱し、反応器内部を攪拌または反応器外部を振動することによって、各反応器内部の合成反応を促進させ、各反応器内部に生成化合物を生成するように構成されている。

40

【0003】

従来の固相合成装置において、生成化合物を取得するまでの一連の操作を、図 3 を参照して説明する。複数個の配列された合成反応をおこなう各反応容器の底部には加圧通液型フィルターと、各反応容器ごとに配備された回収容器がある。図 3 に示すように、先ずレジジン粒子を反応容器に充填する。次に所定量の試薬を反応容器に添加する。反応容器の温度を、温度調節計にて所定の温度に調節し、反応器外部を回転振動させるかあるいは反応器内部に攪拌羽根または攪拌子を設置して、攪拌操作を所定時間実施する。次に反応器内を加圧して試薬を除去し、続いて洗浄溶媒を添加してレジンを洗浄する。洗浄は残存試薬が検出されなくなるまで複数回繰り返す。次に、切り出し液を添加し、所定時間放置したのち、レジンから生成化合物を下部から抜き出す。この際反応器内を加圧して、回収容器

50

に生成化合物を取得する。切り出し液としては、生成化合物が何かによるが、切り出し液には、強酸性溶液か強塩基性溶液が用いられる。代表的な強塩基性溶液として、ナトリウムメトキシド/メタノール溶液などが、また代表的な強酸溶液としてフッ酸やトリフルオロメタンスルホン酸など知られている。

【0004】

また、このような、試薬の導入 - 反応 - 洗浄 - 分離及び精製 - 生成化合物の取得操作を自動化した自動合成装置としては固相合成と液相合成のものがあり、例えば、特許文献1及び2に記載のものが挙げられる。

【0005】

しかしながら、特許文献1又は2に記されているような従来の固相自動合成装置は、図3に代表されるように、充填したレジンを対し反応容器が大きく、またレジンを十分に浸漬させるために過剰量の試薬や溶媒を必要とし、そのため、よい混合を実現するために攪拌混合の動力手段を備えざるえない固相自動合成装置であった。さらに、複数個の反応容器と複数個の試薬や溶媒容器を備えた自動合成装置の場合、過剰の試薬や溶媒の量は著しいものとなり、無駄な廃液量が多く、環境負荷が高いという欠点があった。

10

【0006】

【特許文献1】特開平5 - 192563号公報

【特許文献2】特開2000 - 97947号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0007】

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、省資源・省エネルギーに関する観点から、過剰な試薬を使用せず、攪拌混合の動力手段の必要がない固相自動合成装置を提供することを解決すべき課題とした。

【0008】

また、固相合成を行う場合、反応は一定温度で行うことが多く、遅い反応を扱う場合、反応を昼夜ないし数日おこなうこともある。また、固相の洗浄においても、固相のレジンの粒子径とフィルター目開きの大きさの選び方によって、洗浄溶媒の迅速かつ円滑な送液の可能性、すなわち洗浄時間の短縮の可能性が決まる。また固相レジンの乾燥操作においても乾燥の雰囲気乾燥時間の短縮の可能性を決める。本発明においては、固相合成を迅速に行い、固相を迅速に洗浄し、固相を迅速に乾燥することを同時に達成し、固相自動化装置において合成や洗浄に費やす時間を短縮することを解決すべき課題とした、即ち、本発明は、自動合成装置の全操作時間を短縮することを解決すべき課題とした。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、省資源・省エネルギーに関する観点から、過剰な試薬を使用せず、攪拌混合の動力手段の必要がない固相自動合成装置を提供し、ついで、本固相自動合成装置において、内部の各部分の仕様や操作性を工夫することで、固相合成を素早く行い、固相を素早く洗浄し、固相を素早く乾燥し、合成や洗浄に費やす時間を短縮することに成功した。すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

40

【0010】

(1) 合成反応を行うための複数の反応試薬及び溶媒の保管容器、該反応試薬及び溶媒を微小管状反応管に供給するための配管、該反応試薬及び溶媒を微小管状反応器に供給させるための送液手段、微小管状反応器に所望の反応試薬及び溶媒だけを供給させるための切り替えバルブ、並びに反応基質固定化用担体が充填された微小管状反応器を含む固相自動合成装置であって、前記微小管状反応器内に必要量の反応試薬を送液後、送液を停止した状態で所望の合成反応を行わせ、反応終了後、担体に固定化された反応物以外の反応試薬を溶媒にて洗浄除去できる機能を有することを特徴とする固相自動合成装置。

【0011】

50

(2) 微小管状反応器の内径が0.1~10cmであり、容量が0.5~10mlである、(1)に記載の固相自動合成装置。

(3) 反応基質固定化用担体が樹脂である、(1)又は(2)に記載の固相自動合成装置。

(4) 反応試薬の必要量が反応管に充填された樹脂の膨潤相当量である、(3)に記載の固相自動合成装置。

【0012】

(5) 樹脂の膨潤が終了したことを液面センサーで検知して、送液を自動的に停止する機構を有する、(3)又は(4)に記載の固相自動合成装置。

(6) 樹脂の粒子径が、膨潤状態で2~500ミクロンである、(3)から(5)の何れかに記載の固相自動合成装置。 10

(7) 多糖類合成用である、(1)から(6)の何れかに記載の固相自動合成装置。

【0013】

(8) N個の配列された試薬及び溶媒容器群と、M個の配列された微小管状反応器群を含み、該試薬及び溶媒容器群と該微小管状反応器群との間に配置される切り替えバルブ群に関して、試薬及び溶媒容器群に接続されるM方切り替えバルブ群と微小管状反応器群に接続されるN方切り替えバルブ群(ここで、Mは2~20の整数であり、Nは2~20の整数である)を備えている、(1)から(7)の何れかに記載の固相自動合成装置。

(9) M個の微小管状反応器が直列に接続されている、(8)に記載の固相自動合成装置。 20

(10) 微小管状反応器の温度を調節するための温度調節部をさらに有し、該温度調節部が、初期温度と、終期温度と、初期温度と終期温度との間の昇温速度とを設定制御できる機能を有する、(1)から(9)の何れかに記載の固相自動合成装置。

【0014】

(11) 以下のAブロック~Hブロックから構成される、(1)から(10)の何れかに記載の固相自動合成装置。

(A) ガス容器B1の不活性ガスを用いて送液操作を行う流量計MF1と乾燥操作を行う流量計MF2を備え、3方切り替えバルブV13により、乾燥操作か送液操作かが選択されるAブロック；

(B) 溶媒容器B2と溶媒容器B3からの極性溶媒及び無極性溶媒を用いて洗浄操作を行うためのポンプP1とポンプP2を備える、Bブロック； 30

(C) X個(Xは2~17の整数を示す)の反应用的試薬ボトルB4からBY(ここで、YはX+3で表される整数を示す)の試薬を吸引して送液する操作を行うシリンジポンプS4からSYを備え、吸引か送液かを選択するためにX個の3方切り替えバルブV14からVZ(Z=X+13で表される整数を示す)を備える、Cブロック；

(D) Aブロックの不活性ガス、Bブロックの洗浄溶媒、CブロックのX個の試薬群を複数の反応容器に配分するための切り替えY個のバルブ群V1からVYを備える、Dブロック；

(E) Aブロックの不活性ガス、Bブロックの洗浄溶媒、CブロックのX個の試薬群をそれぞれ所定のM個(Mは2~20の整数を示す)の反応容器に供給するためのM個の切り替えバルブと、反応器をバイパスして上流のバルブ群を乾燥したい場合に使用するM個の3方切り替えバルブを備える、ブロックE； 40

(F) 固相であるレジン粒子を充填したM個の反応容器をブロックに固定保持した部分と温度センサーと液面センサーとを備える、ブロックF；

(G) M個の反応容器を通液した溶媒及び各種の試薬液を回収するトラップと切り出した生成液を回収するM個の回収ボトルを備える、ブロックG；及び

(H) AブロックからGブロックの流量制御、バルブ制御、温度制御及び液面制御を行うための手段を備える、Hブロック。

【0015】

(12) M個の反応容器を同時に溶媒洗浄でき、またM個の反応容器を同時に乾燥する 50

ことができるように、AブロックとBブロックとEブロックにさらに追加の3方切り替えバルブが備えられている、(11)に記載の固相自動合成装置。

【0016】

(13) (1)から(12)の何れかに記載の固相自動合成装置を用いて、固相自動合成を行う方法。

(14) 反応試薬及び溶媒の送液を、不活性ガスを用いて圧送することにより行う、(13)に記載の方法。

(15) 極性溶媒と無極性溶媒を併用して洗浄を行う、(13)又は(14)に記載の方法。

【発明の効果】

10

【0017】

本発明の固相自動合成装置によれば、レジン膨潤量の反応試薬を用いることができるので、過剰な試薬の排出がなく、また攪拌など動力手段が不要である。また、効果的な極性及び無極性の洗浄溶媒を選ぶことによって、洗浄溶媒量を最小化でき、採択する反応の速度に依存するところはあるが、昇温反応により反応時間を短縮でき、適当な大きさレジンと相応のフィルターを選ぶことにより、洗浄時間が短縮され、窒素流通と真空乾燥を併用することにより乾燥時間が短縮化できる。即ち、本発明の固相自動合成装置によれば、省資源・省エネルギーを達成することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

20

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の固相自動合成装置では、ストップフロー反応をマイクロスケールで行うことにより、過剰の試薬を使用することなく効率よく反応を行わせることが可能である。また、自動固相合成の反応工程は煩雑であるが、自動化システムを構成しているので操作が簡単であり自動化が容易である。また、マイクロスケールで行った場合でも、必要とされる量の多糖類、ペプチドを合成するためには十分な規模である。

【0019】

例えば、多糖類の合成例として、以下のようなものが挙げられる。

(1) 微小管状反応器内に、アミノ基を有する樹脂を充填しておく

(2) 反応器に、チオフェニル基を有する単糖カルボン酸と結合試薬とを導入する。

30

(3) ストップフロー反応により、ペプチド結合で単糖を樹脂に結合させる。

(4) 反応液を溶媒で洗浄除去する。

(5) 反応器内に、フッ化単糖誘導体と結合試薬を導入する。

(6) ストップフロー反応により、樹脂に担持された糖とフッ化単糖誘導体とを反応させて、両者をエーテル結合で結合させる。

(7) 反応液を溶媒で洗浄除去する。

(8) 上記(5)～(8)の反応を繰り返し、糖鎖を成長させていく。

【0020】

また、かかる装置はペプチド合成にも応用される。この場合も、アミノ基を有する樹脂、必要に応じ側鎖官能基が保護されているアミノ酸のカルボキシル基と樹脂との間にペプチド結合を形成させる反応を行う。更に、樹脂に担持されたアミノ酸のアミノ基と、次のアミノ酸のカルボキシル基を反応させてペプチド結合を形成させる。かかる反応を繰り返し、糖鎖を成長させていくことができる。

40

【0021】

本発明で用いる反応基質固定化用担体としては、一般的には、通常、溶媒使用時にいくらか膨潤する性質を有する樹脂製のものを使用することが好ましい。但し、樹脂でも架橋度が高いもの、あるいは、シリカなどの無機担体の表面にアミノ基を化学結合させたものや、該無機担体に樹脂をコーティングしたものなどでもよく、これらについては、溶媒に接しても殆ど膨潤しない性質のものがある。かかる反応基質固定化用担体の場合における必要反応試薬量は、担体の細孔部も含む表面を溶媒の膜で覆われる程度の量を意味する。

50

【0022】

続いて、本発明の装置の構成を図面を参照しながら説明する。図1に実施例に関わる固相自動合成装置の全体構成を示すブロック図を示す。本実施例において、試薬及び溶媒容器群に接続されるM方切り替えバルブ群と反応容器群に接続されるN方切り替えバルブ群において、Mが4個、Nが12個であるが、反応容器の個数Mと試薬容器の個数Nが、特にMが4個そしてNが12個に限定されるものではない。

【0023】

必要に応じて、多方切り替えバルブの組み合わせを増やし、反応管系列の増設と拡張が可能であり、多品種の生成物を迅速に作成する操作（ハイスループットスクリーニング）に有利である自動合成装置である。

10

【0024】

(Aブロック)

ガス容器B1の不活性ガスを用いて送液操作を行う流量計MF1と乾燥操作を行う流量計MF2を備える。送液操作を行う流量計の流量は1SCCM (standard cc/min) から10SCCMと低流量が好ましい。乾燥操作を行う流量計の流量は前記の流量計より大きい流量がよく、500SCCMから2000SCCMが好ましい。3方切り替えバルブV13により、乾燥操作か送液操作かを選択する。

【0025】

(Bブロック)

溶媒容器B2と溶媒容器B3から極性溶媒及び無極性溶媒を用いて洗浄操作を行うポンプP1とポンプP2を備える。ポンプの流量は1mL毎分から10mL毎分が好ましい。極性溶媒は分極率の高い溶媒であればよく、レジン中の残存試薬を効率よく洗浄する働きがある。極性溶媒として、N、N'-ジメチルホルムアミド、プロピオニトリル、アセトニトリル、メタノール、エタノール、プロパノール、N-メチルピロリドン、THFなどが使用できる。無極性溶媒は分極率の低い溶媒であればよく、極性溶媒を置換洗浄した後の乾燥操作において、蒸発しやすい性質のものを選べば、乾燥時間が短縮できる。無極性溶媒として、ジクロルエタン、ジクロルメタンなどのハロゲン化炭化水素、ヘキサン、ヘプタンなどの脂肪族炭化水素、及びベンゼンやトルエンなどの芳香族炭化水素が好ましい。

20

また、レジンに水分を残存させないために、極性溶媒及び無極性溶媒のとも、脱水溶媒と呼ばれる水分が極端に除去された溶媒を使うことが好ましい。

30

【0026】

(Cブロック)

複数の反应用の試薬ボトルB4からB12の試薬を吸引し送液する操作を行うシリンジポンプS4からS12を備える。吸引か送液かを選択するために3方切り替えバルブV14からV22を備える。シリンジポンプに使用するシリンジの大きさは合成の規模に依存するが通常1mLから10mLで十分である。

【0027】

(Dブロック)

Aブロックの不活性ガス、Bブロックの洗浄溶媒、Cブロックの複数の試薬群を複数の反応容器に配分するための切り替えバルブ群V1からV12を備える。バルブは市販のものが使用でき、バルブの材質は耐食性かつ耐有機溶剤性のものがよく、特にテフロン（登録商標）製またはテフロン（登録商標）でコートしたSUS製が好ましい。バルブの耐圧性は0.1MPaから1MPaあれば十分である。またコンタミをさけるため、好ましくは死容積の小さいバルブがよい。

40

【0028】

(Eブロック)

Aブロックの不活性ガス、Bブロックの洗浄溶媒、Cブロックの複数の試薬群をそれぞれ所定の反応容器に供給するための切り替えバルブ群VA、VB、VC、VDを備える。反応器をバイパスして上流のバルブ群の乾燥したい場合使用する3方切り替えバルブV2

50

3 から V 2 6 を備える。バルブの材質と耐圧性は前記同様である。

【 0 0 2 9 】

(F ブロック)

固相であるレジン粒子を充填した反応容器 R 1 から R 4 をアルミ製ブロックに固定保持した部分と温度センサーと液面センサーを備える。

固相であるレジンの具体例としては、各種の樹脂、例えば、ポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ポリエーテル系樹脂、及びそれらの複合樹脂や、または多孔質ガラス、多孔質ビーズ、キャピラリーシリカやマイクロチップなどの微細流路、セファロースなどが挙げられる。これらはいずれも、固相合成に際してリンカーやスパーサーなどを連結するための足場となる、アミノ基、プロモメチル基、水酸基、チオール基、カルボキシル基などの官能基を有しているものであって、さらに適当な側鎖や修飾などを有するものであってよい。

10

【 0 0 3 0 】

(G ブロック)

反応管 R 1 から R 4 に通液した、溶媒及び各種の試薬液を回収するトラップと切り出した生成液を回収する回収ボトル T 1 から T 4 を備える。また不活性ガスを流しながら、真空排気による乾燥操作をおこなう真空ラインを備える。

【 0 0 3 1 】

(H ブロック)

あらかじめプログラム設定された A ブロックの流量制御、B ブロックの流量制御と圧力の監視、C ブロックの流量制御と切り替えバルブ操作、D ブロックの切り替えバルブ操作、E ブロックの切り替えバルブ操作、F ブロックの温度制御と温度の監視と液面制御、G ブロックのバルブ開閉操作と真空動力のオンオフの操作を、シーケンサーを経由しておこなう、タッチパネル型制御計またはパーソナルコンピューターを備える。

20

【 0 0 3 2 】

続いて、本発明の固相自動合成装置の反応工程と洗浄工程と乾燥工程の特徴について記述する。

(本発明の固相自動合成装置の反応工程における特徴)

試薬や溶媒の拡散混合時間を節約するためには、反応容器は小型であることがよく、反応管 1 系列の内径が 1 0 0 ~ 1 2 0 0 0 0 ミクロン、好ましくは 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 ミクロンで、その長さが 0 . 3 mm から 3 0 0 0 0 0 mm かつその容量が 1 0 mL 以下であり、好ましくは 1 mL 以下であり、より好ましくは 0 . 5 mL である。同体積であれば、好ましくは円盤状よりは円筒状の管である反応管を採用する。

30

【 0 0 3 3 】

また、反応試薬の使用量を必要最小量の「反応管に保持されたレジンの膨潤相当量」とし、過剰の試薬の量を用いることなく、環境負荷が少ない方法である。さらにこの方式は別の利点をもつ。すなわち、レジンとは多孔質体であり、反応管に保持されたレジン内部の微小流路内で反応を実施するため、本質的に拡散混合時間 t が短い。

【 0 0 3 4 】

$$t = r^2 \div D \quad (\text{式 1})$$

40

t : 拡散混合時間 r : 多孔質体の細孔半径 D : 拡散係数

【 0 0 3 5 】

例えば、細孔半径が 1 0 ミクロンの多孔質体内でのショ糖の拡散は、 $D = 0 . 5 \times 1 0^{-9} \text{ m}^2 / \text{sec}$ であり、(式 1) によれば、拡散混合時間は 1 秒以内である。試薬の攪拌のために振動や回転などの動力をまったく用いる必要はないといえる。

【 0 0 3 6 】

本発明では、必要最小量であるレジン膨潤量の反応試薬を反応管内に保持されたレジンまで輸送するのに、窒素などの不活性ガスを用いて圧送し、レジンに液が到達し膨潤が終了したことを液面センサーで検出し、送液を停止することができる。すなわち、液面センサーを反応管の出口に設置してレジンに試薬が浸みだしてきた時点で液面を検出し、送液

50

を停止し、不必要に試薬が供給されることを確実に防止することができる。

【0037】

反応部のプログラム温度制御に関して、取り扱う反応の活性化エネルギー E_a と生成物の熱分解性を考慮して、遅い反応であれば、適切な初期温度と終期温度と保持時間と昇温速度を設定し、昇温反応を実施して、反応時間を短縮することが可能である。

$$k(T + \Delta T) / k(T) = \exp(-E_a / R(1/(T + \Delta T) - 1/T)) \quad (\text{式2})$$

k : 1次速度定数 T : 温度 ΔT : 温度差 E_a : 活性化エネルギー

【0038】

例えば、活性化エネルギー $E_a = 50 \text{ Kcal/mol}$ の1次反応であれば、反応温度を30℃ 上げることにより反応速度が約2倍となり、よって反応時間を約1/2に短縮できる。

10

【0039】

(本発明の固相自動合成装置の洗浄工程における特徴)

レジン内に残存する試薬化合物の洗浄効果の向上させるために、 N, N' -ジメチルホルムアミドなどの極性溶媒とジクロロエタンなどの無極性溶媒を併用する。通常レジン内に残存しやすい化合物は水などの極性を有する化合物である。これらを除くには、極性溶媒がよい。本法においては、レジン約100mg に対し、レジン内部に浸透した試薬を最初に約2Lの窒素で送り追いつき、次にラインを洗浄するためにジクロロエタン等の無極性溶媒を約5mLで洗い、次にレジン中の極性化合物を除去するために N, N' -ジメチルホルムアミド等の極性溶媒で約10mLで洗い、最後にジクロロエタン等の無極性溶媒を約5mLで洗う。最後に無極性溶媒で洗うのは極性溶媒が一般に沸点が高く、乾燥工程での蒸発除去に時間がかかるため、乾燥時間の節約のため必要である。合計の洗浄時間は約20分である。

20

【0040】

また、洗浄工程においてはレジン粒子の大きさとレジンを持続するために設けられているフィルター目開きの大きさにより、閉塞や圧上昇の問題があり、迅速かつ円滑な洗浄のためには、適当な大きさを採用する必要がある。

【0041】

本法においては、固相として使用するレジンの粒子径が溶媒を吸収した状態で2~500ミクロン、特に300~400ミクロンであることが好ましい。また、レジン反応容器内に保持する際に、使用するフィルター目開きが30ミクロン以上、好ましくは100ミクロン以上でレジンを出さない大きさであるものを採用することが好ましい。市販のフィルターは、例えばLC用のものは5ミクロンから20ミクロンであり、送液にかなり圧がかかる。本法のものを使用すれば圧は0.5MPa程度である。

30

【0042】

(本発明の固相自動合成装置の乾燥工程における特徴)

レジン中の溶媒を除去するために、Aブロックより約2Lの窒素を流通するが、真空ポンプを用いて反応管内を減圧にし、乾燥を迅速におこなうことができる。乾燥時間は約30分である。

【0043】

さらなる洗浄時間と乾燥時間の短縮の方法として、図2では、AブロックとBブロックとEブロックに追加の3方切り替えバルブV35~V44を備えた自動合成装置を提案する。この方式では、反応容器R1~R4を同時に溶媒洗浄操作可能であり、また同時に乾燥操作可能であるので、著しく操作時間の短縮が可能である。

40

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0044】

上記した図1又は図2に記載の本発明の固相自動合成装置を用いて糖を合成する実施例を以下に示す。

50

【0045】

1. 糖鎖合成における固相自動合成装置の自動操作法

参考文献 J. Am. Chem. Soc. 116、12073 - 12074 (1994) に記載される反応の方法により、ベンジル基を保護基とする保護単糖、フェニル - 1 - チオ - 2, 3 - ジベンジル - 4 - O - サクシニル - L - フコピラノシド (試薬 A と略す)、3, 4, 6 - トリ - O - ベンジル - D - ガラクトピラノシルフルオリド (試薬 B と略す)、フェニル - 1 - チオ - 2, 3, 6 - トリ - O - ベンジル - D - グルコピラノシド (試薬 C と略す) を用いて、グルコース - ガラクトース - フコースの 3 糖誘導体を自動合成する。

【0046】

2. レジンのセットアップ

Novabiochem 社の NovasynTG アミノレジン (アミノ基濃度 0.29 mmol/g) 15 mg を反応管 R1 に充填する。

【0047】

3. 試薬のセットアップ

ボトル B2 に脱水ジクロルエタンを 200 ml、ボトル B3 に脱水 N, N' - ジメチルホルムアミド (DMF と略す) を 200 ml 入れる。

シリンジ S4 に、試薬 A を 5 mg、N, N' - ジイソプロピルカルボジイミド 2 μ l 及び 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール 2 mg を脱水 DMF 0.2 ml に溶解して充填する。

シリンジ S5 に、試薬 B を 3 mg、ジメチルジスルフィド 3 μ l 及びメチルトリフラート 3 μ l を脱水ジクロルエタン 0.05 ml と脱水アセトニトリル 0.05 ml に溶解させ、モレキュラーシーブ 4A を 2 mg 添加し、ろ過したものを充填する。

シリンジ S6 に、試薬 C を 3 mg 及びトリフル酸銀 5 mg を脱水ジクロルエタン 0.06 ml と脱水アセトニトリル 0.06 ml に溶解させ、モレキュラーシーブ 4A を 4 mg 添加し、ろ過したものを充填する。

シリンジ S7 に、1 - オクタノール 8 μ l、ジメチルスルフィド 3 μ l 及びメチルトリフラート 3 μ l を脱水ジクロルエタン 0.06 ml と脱水アセトニトリルに溶解させ、モレキュラーシーブ 4A を 2 mg 添加し、ろ過したものを充填する。

シリンジ S8 に、ピリジン 0.5 ml と無水酢酸 0.5 ml を混合したものを充填する。

シリンジ S9 に、0.25 M ナトリウムメトキシド・メタノール溶液を 1 ml 充填する。

【0048】

4. レジンの乾燥

質量流量計 MF2 から窒素を反応管 R1 に流せるようにバルブ V13、バルブ V1、バルブ VA、バルブ V23、バルブ V27 を切り替え、反応管 R1 を真空ラインで脱気できるように、バルブ V31 を切り替え、反応管 R1 に窒素を 30 分間流し、アミノレジンを洗浄及び乾燥する。

【0049】

5. 1 糖目のレジンへの結合

反応管 R1 の温度を 20 $^{\circ}$ C にする。反応管 R1 にシリンジ S4 から試薬を流せるように、バルブ V14、バルブ V4、バルブ VA、バルブ V23、バルブ V27、バルブ V31 を切り替え、シリンジ S4 より、送液流量 100 μ /min で 0.12 ml 量を送液し、所定量に達したら、シリンジポンプを停止する。次に質量流量計 MF1 から窒素を反応管 R1 に流せるように、バルブ V13、バルブ V1、バルブ VA を切り替え、窒素を 1 SCCM 以下で流し、反応試薬を反応管 R1 へ導く。レジンの膨潤が終了し、反応試薬が反応管 R1 の出口に達し、出口に設置された液面センサーで反応試薬の存在を検知したら、バルブ V13、バルブ V23、バルブ V27 を閉とし、反応管内に反応試薬を保ったまま、12 時間静置し、反応を行う。

10

20

30

40

50

【0050】

6. 洗浄と乾燥

質量流量計MF2から窒素を反応管R1からトラップボトルに流せるように、バルブV13、バルブV1、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、窒素を100ml/minの流量で流し、反応液をトラップボトルに回収する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1ml/minで反応管内のレジンを5分間洗浄し、ポンプP2を停止する。次に、ボトルB3からDMFを流せるように、ポンプP3を起動し、バルブV3、バルブVAを切り替えて、DMF流量1ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP3を停止する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP2を停止する。

10

【0051】

7. 残アミノ基のキャッピング

反応管R1の温度を20にする。反応管R1にシリンジS8から試薬を流せるように、バルブV18、バルブV8、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、シリンジS8より、送液流量100μ/minで送液し、試薬を反応管R1へ導き、試薬が反応管R1の出口に達し、出口に設置された液面センサーで試薬の存在を検知したら、バルブV13、バルブV23、バルブV27を閉とし、反応管内に反応試薬を保ったまま、12時間静置し、レジン中のアミノ基を無水酢酸でキャッピングする反応を行う。

20

【0052】

8. 洗浄と乾燥

質量流量計MF2から窒素を反応管R1からトラップボトルに流せるように、バルブV13、バルブV1、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、窒素を100ml/minの流量で流し、反応液をトラップボトルに回収する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1ml/minで反応管内のレジンを5分間洗浄し、ポンプP2を停止する。次に、ボトルB3からDMFを流せるように、ポンプP3を起動し、バルブV3、バルブVAを切り替えて、DMF流量1ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP3を停止する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP2を停止する。

30

【0053】

9. 2糖目の結合

反応管R1の温度を0にする。反応管R1にシリンジS5から試薬を流せるように、バルブV15、バルブV5、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、シリンジS5より、送液流量100μ/minで0.10ml量を送液し、所定量に達したら、シリンジポンプを停止する。次に質量流量計MF1から窒素を反応管R1に流せるように、バルブV13、バルブV1、バルブVAを切り替え、窒素を1SCC M以下で流し、反応試薬を反応管R1へ導く。レジンの膨潤が終了し、反応試薬が反応管R1の出口に達し、出口に設置された液面センサーで反応試薬の存在を検知したら、バルブV13、バルブV23、バルブV27を閉とし、反応管内に反応試薬を保ったまま、12時間静置し、反応を行う。

40

【0054】

10. 洗浄と乾燥

質量流量計MF2から窒素を反応管R1からトラップボトルに流せるように、バルブV13、バルブV1、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え

50

、窒素を100 ml/minの流量で流し、反応液をトラップボトルに回収する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1 ml/minで反応管内のレジンを5分間洗浄し、ポンプP2を停止する。次に、ボトルB3からDMFを流せるように、ポンプP3を起動し、バルブV3、バルブVAを切り替えて、DMF流量1 ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP3を停止する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1 ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP2を停止する。

【0055】

10

11.3 糖目の結合

反応管R1の温度を-15℃にする。反応管R1にシリンジS6から試薬を流せるように、バルブV16、バルブV6、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、シリンジS6より、送液流量100 μ/minで0.12 ml量を送液し、所定量に達したら、シリンジポンプを停止する。次に質量流量計MF1から窒素を反応管R1に流せるように、バルブV13、バルブV1、バルブVAを切り替え、窒素を1 SCCM以下で流し、反応試薬を反応管R1へ導く。レジンの膨潤が終了し、反応試薬が反応管R1の出口に達し、出口に設置された液面センサーで反応試薬の存在を検知したら、バルブV13、バルブV23、バルブV27を閉とし、反応管内に反応試薬を保ったまま、反応温度を-15℃から20℃に昇温速度1℃/hで温度を上げながら、その間12時間静置し、反応を行う。

20

【0056】

12. 洗浄と乾燥

質量流量計MF2から窒素を反応管R1からトラップボトルに流せるように、バルブV13、バルブV1、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、窒素を100 ml/minの流量で流し、反応液をトラップボトルに回収する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1 ml/minで反応管内のレジンを5分間洗浄し、ポンプP2を停止する。次に、ボトルB3からDMFを流せるように、ポンプP3を起動し、バルブV3、バルブVAを切り替えて、DMF流量1 ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP3を停止する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1 ml/minで反応管内のレジンを5分間洗浄し、ポンプP2を停止する。

30

【0057】

13.1 -オクタノールによるエステル誘導体化

反応管R1の温度を20℃にする。反応管R1にシリンジS7から試薬を流せるように、バルブV17、バルブV7、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、シリンジS7より、送液流量100 μ/minで送液し、試薬を反応管R1へ導き、試薬が反応管R1の出口に達し、出口に設置された液面センサーで試薬の存在を検知したら、バルブV13、バルブV23、バルブV27を閉とし、反応管内に反応試薬を保ったまま、12時間静置し、レジンの3糖誘導体の1-オクタノール化反応を行う。

40

【0058】

14. 洗浄と乾燥

質量流量計MF2から窒素を反応管R1からトラップボトルに流せるように、バルブV13、バルブV1、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、窒素を100 ml/minの流量で流し、反応液をトラップボトルに回収する。次に、ボトルB2からジクロロエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロロエタン流量1 ml/min

50

inで反応管内のレジンを5分間洗浄し、ポンプP2を停止する。次に、ボトルB3からDMFを流せるように、ポンプP3を起動し、バルブV3、バルブVAを切り替えて、DMF流量1ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP3を停止する。次に、ボトルB2からジクロルエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロルエタン流量1ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP2を停止する。

【0059】

15. 切り出し

反応管R1の温度を20にする。反応管R1にシリンジS9から試薬を流せるように、バルブV19、バルブV9、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、シリンジS9より、送液流量100μl/minで送液し、試薬を反応管R1へ導き、試薬が反応管R1の出口に達し、出口に設置された液面センサーで試薬の存在を検知したら、バルブV13、バルブV23、バルブV27を閉とし、反応管内に反応試薬を保ったまま、2時間静置し、レジン中の3糖誘導体の切り出し反応を行う。

10

【0060】

16. 生成物の回収

反応管R1の温度を20にする。反応管R1に質量流量計MF2から窒素を流し、上記切り出し液をボトルT4に回収できるように、バルブV13、バルブV1、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、質量流量計MF2より、流量100ml/minで窒素を流し、切り出し液をT4へ導き、回収する。

20

【0061】

17. 操作終了後の反応管の洗浄と乾燥

質量流量計MF2から窒素を反応管R1からトラップボトルに流せるように、バルブV13、バルブV1、バルブVA、バルブV23、バルブV27、バルブV31を切り替え、窒素を100ml/minの流量で流し、反応液をトラップボトルに回収する。次に、ボトルB2からジクロルエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロルエタン流量1ml/minで反応管内のレジンを5分間洗浄し、ポンプP2を停止する。次に、ボトルB3からDMFを流せるように、ポンプP3を起動し、バルブV3、バルブVAを切り替えて、DMF流量1ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP3を停止する。次に、ボトルB2からジクロルエタンを反応管R1経由でトラップボトルに流せるように、ポンプP2を起動し、バルブV2、バルブVAを切り替えて、ジクロルエタン流量1ml/minで反応管内のレジンを10分間洗浄し、ポンプP2を停止する。

30

【0062】

以上は、糖鎖の合成例であり、用いる試薬の流量および窒素の流量及び反応温度および反応時間等が、特に制約されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】図1は、本発明の実施例に関わる固相自動合成装置の全体構成を示すブロック図である。(Aブロック) B1:不活性ガス容器、MF1:低流量質量流量計、MF2:高流量質量流量計 V13:3方切り替えバルブ(Bブロック) B2、B3:洗浄溶媒容器、P2、P3:溶媒送液用のポンプ、圧力センサー2点(Cブロック) S4~S12:合成用の試薬を送液するためのシリンジポンプ、B4~B12:合成用の試薬容器、圧力センサー9点(Dブロック) V1~V12:試薬及び溶媒容器群に接続される3方切り替えバルブ群(Eブロック) VA,VB,VC,VD:反応容器群に接続される12方切り替えバルブ群、V23~V26:真空ラインのトラップにバイパスするための3方切り替えバルブ群(Fブロック) R1~R4:所定量のレジン粒子を充填した反応容器(反応管) アルミブロックに保持固定、温度センサー4点、出口液面センサー4点(Gブロック): V27~V30:反応容器出口を閉止するための2方バルブ、V31~V34:真空ラインと回収容器へのラインを選択する3方バルブ 圧力センサー4

40

50

点（Hブロック）： AブロックからGブロックの流量制御、バルブ制御、温度制御及び液面制御部

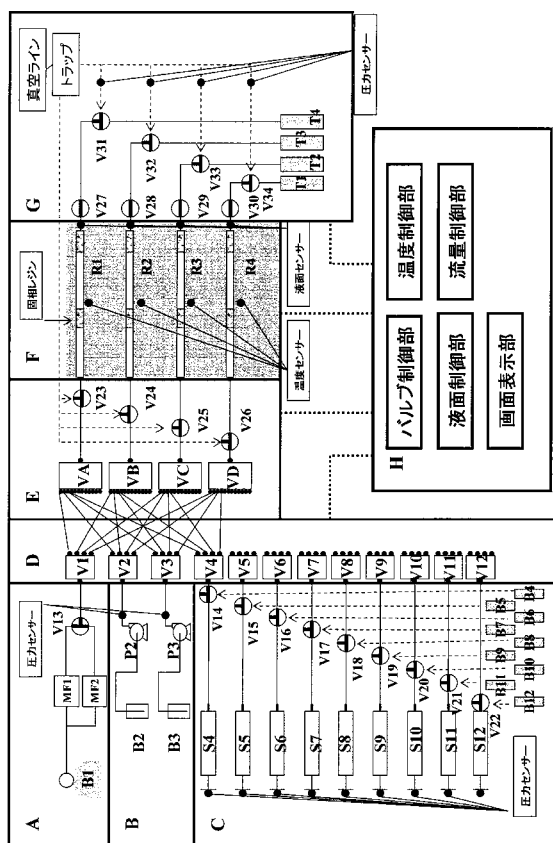
【図2】図2は、複数の反応容器について同時に洗浄操作及び同時に乾燥操作を可能とし操作時間の短縮を企図した固相自動合成装置の全体構成を示すブロック図である。（Aブロック） B1：不活性ガス容器、MF1：低流量質量流量計、MF2：高流量質量流量計 V13、V43：3方切り替えバルブ（Bブロック） B2、B3：洗浄溶媒容器、P2、P3：溶媒送液用のポンプ、圧力センサー2点、V44、V45：3方切り替えバルブ（Cブロック） S4～S12：合成用の試薬を送液するためのシリンジポンプ、B4～B12：合成用の試薬容器、圧力センサー9点（Dブロック） V1～V12：試薬及び溶媒容器群に接続される3方切り替えバルブ群（Eブロック） VA、VB、VC、VD：反応容器群に接続される12方切り替えバルブ群、V23～V26、V35～V42：不活性ガスと溶媒のバイパス用の3方切り替えバルブ群（Fブロック） R1～R4：所定量のレジンを充填した反応容器（反応管） アルミブロックに保持固定、温度センサー4点、出口液面センサー4点（Gブロック）： V27～V30：反応容器出口を閉止するための2方バルブ、V31～V34：真空ラインと回収容器へのラインを選択する3方バルブ 圧力センサー4点（Hブロック）： AブロックからGブロックの流量制御、バルブ制御、温度制御及び液面制御部

10

【図3】図3は、従来の固相合成装置における一連の操作を示す図である。

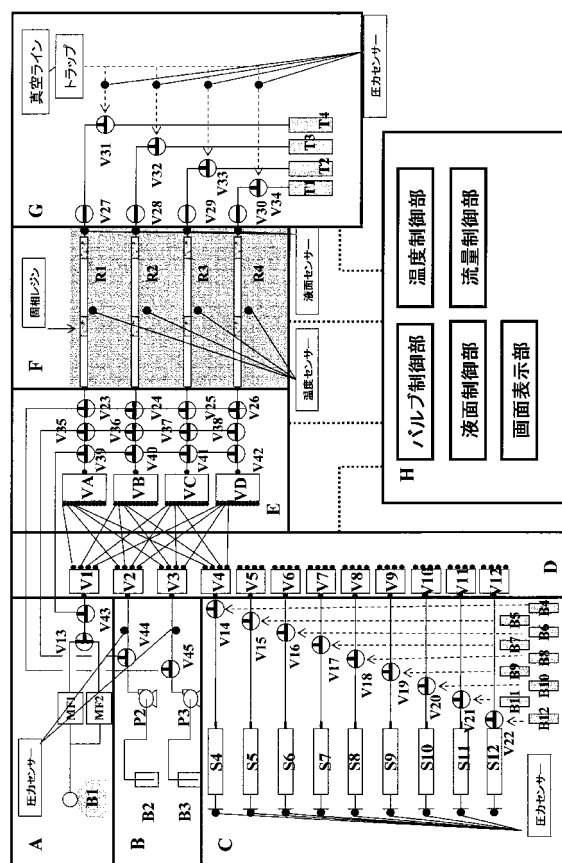
【図1】

【図1】 反応容器(M=4個)試薬(N=12個)型 固相自動合成装置



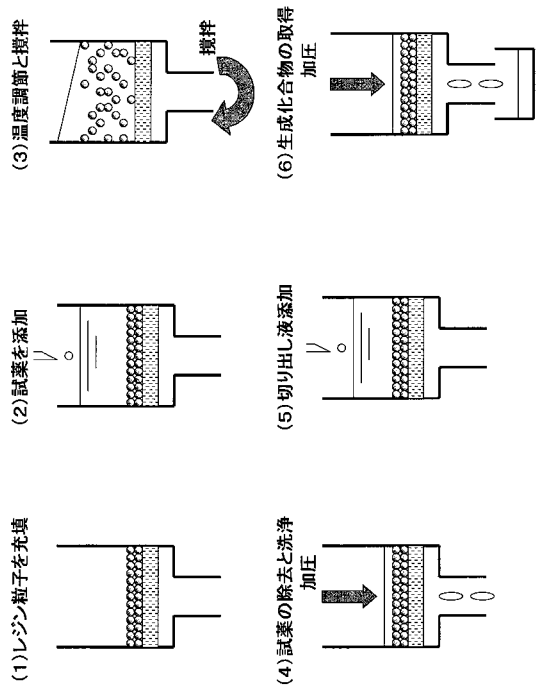
【図2】

【図2】 反応容器(M=4個)試薬(N=12個)型 固相自動合成装置



【 図 3 】

【 図 3 】 従来の固相合成装置における一連の操作を示す図



フロントページの続き

(72)発明者 蟹江 治

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学生命科学研究室内

(72)発明者 西野 充晃

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内

Fターム(参考) 4G075 AA23 AA39 AA61 AA62 AA65 BA02 BB02 BB03 BB10 BD15

BD16 CA63