

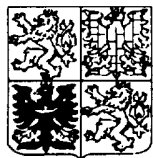
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 615

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **4057-92**

(22) Přihlášeno: 31. 12. 92

(40) Zveřejněno: 13. 07. 94

(47) Uděleno: 18. 01. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13. 03. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
C 07 K 1/04

(73) Majitel patentu:

Ústav organické chemie a biochemie AVČR,
Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Mudra Petr ing., Praha, CZ;

Kalousek Jan, Praha, CZ;

Pavlík Manfred ing. CSc., Praha, CZ;

Ženíšek Karel ing., Praha, CZ;

Voburka Zdeněk ing., Praha, CZ;

Pokorný Vít ing., Praha, CZ;

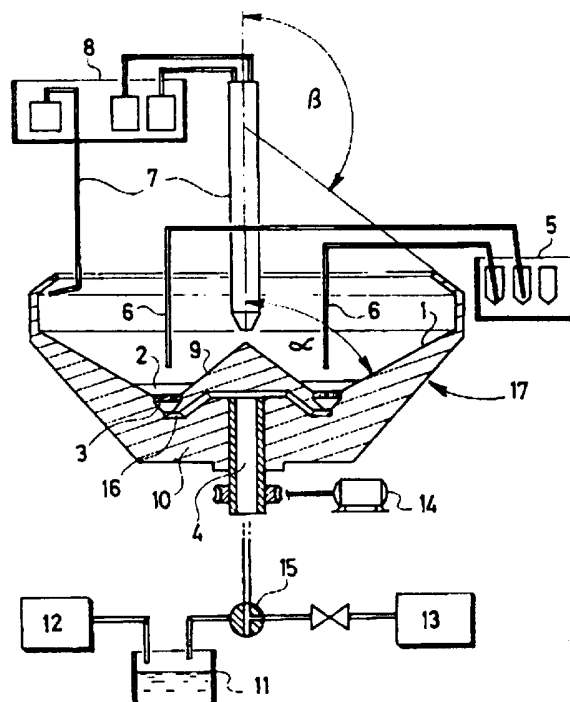
Rínnová Markéta Mgr., Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Reaktor pro multisekvenční syntézu
peptidů**

(57) Anotace:

Reaktor pro multisekvenční syntézu peptidů s randomizací, tvořený nádobou (1), jejíž dno (10) je opatřeno středovým kuzelem (9), mezi nímž a stěnami (17) nádoby (1) jsou vytvořeny komůrky (2), ze spodní strany uzavřené fritou (3), pod níž je vytvořen výpustný kanálek (16), spojený se sifonem (4), jehož výstup je připojen přes přepínací ventil (15) jednak k zásobníku (13) inertního plynu, a jednak k nádobě (11) odpadu. Nádoba (1), jejíž stěny (17) ve spodní části svírají se svislou osou reaktoru ostrý úhel (α) v rozmezí od 1° do 89° a v horní části tupý úhel (β) v rozmezí od 91° do 179° , je opatřena pohonem (14) pro otáčení kolem její svislé osy, přičemž nad nádobou (1) jsou umístěny přívody (7) rozpouštědel a činidel a nad jednotlivými komůrkami přívody (6) roztoků aminokyselin.



Reaktor pro multisekvenční syntézu peptidů

Oblast techniky

Vynález se týká reaktoru pro multisekvenční syntézu peptidů na pevném nosiči s randomizací.

Dosavadní stav techniky

Syntéza peptidů na pevné fázi podle R.B. Merrifielda, popsána například v publikaci "Stewart J.M. and Young J.D., Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman, San Francisco, 1985" vnesla do této oblasti syntézy peptidů i možnosti částečné nebo úplné automatizace, viz Merrifield R.B., Stewart J.M. and Jarnberg N., Apparatus for the automated synthesis of peptides, US 3,531,258; Brunfeldt K. Roepstorff P. and Halstrom J., Reaction system, US 3,557,077; Kubodera T., Hara I. and Makabe H., Apparatus for synthesis of peptides or the like organic compounds, US 3,647,390; Won Kil Park and D. Regoli, System for the solid phase synthesis, US 3,715,190; Bridgham J. et al., Automated polypeptide synthesis apparatus, US 4,668,476; Saneii H.H., Solid phase synthesizer, US 4,746,490, a tím i řadu realizovaných nebo navrhovaných syntetizátorů. V zásadě se liší chemickou metodologií syntézy, nejčastěji Fmoc nebo Boc strategií: Atherton E. and Sheppard R.C., 1989, Solid phase peptide synthesis. A practical approach. IRL Oxford University Press; Barany G. and Merrifield R.B., 1980, Solid-phase peptide synthesis, The peptides, Gross and Meienhofer (Eds.) str. 1-284, Academic Press, nebo nosičem, různé druhy polymerů, bavlna a podobně, Alternative Carriers and Methods in Solid Phase Synthesis; Lebl M., Eichler J. and Bienert M. Peptides 1990, Giralt and Andren (Eds.); str. 153-155, a nebo technickým a konstrukčním řešením.

V krátkosti lze syntézu peptidů popsat jako postupné stavění řetězce z aminokyselin, propojených peptidovou vazbou ($-CO-NH-$), kdy k připojení každé následující aminokyseliny dojde po odchránění aminokyseliny předchozí, za účasti aktivního činidla. Na pevné fázi tento proces probíhá tak, že první aminokyselina je navázána vhodným způsobem na pevný nosič a celý peptid tak v závěru syntézy zůstává zachycen na nosiči a k jeho získání je nutné konečné štěpení z nosiče. Obvyklými rozpouštědly, užívanými k syntéze, jsou dimethylformamid, vhodný spíše pro Fmoc strategii, nebo dichlormethan, vhodný pro Boc strategii. Pro postupné odchránování koncových aminokyselin se užívá v případě Fmoc syntézy asi 20% piperidin v dimethylformamidu, a v případě Boc syntézy asi 50% trifluoroctová kyselina v dichlormethanu. Pro finální štěpení z nosiče se používá v případě Fmoc syntézy trifluoroctová kyselina s 5 až 10 % specifických látek v různých poměrech, a v případě Boc syntézy obvykle fluorovodík, někdy též s přísadami.

Dosud známá konstrukční řešení syntetizátorů se zaměřují na současnou syntézu maximálního množství daných peptidů, nebo na syntézu pouze jednoho a nebo omezeného počtu peptidů v maximálně možné kvalitě a případně i množství. V nedávné době k těmto dvěma přístupům přibyl ještě další, jehož snahou je získat všechny možné kombinace aminokyselinových řetězců o zvolené délce a z předem zvolených aminokyselin, a tento způsob je popsán v Lam K.S., Sal-

mon S.E., Hersh E.M., Hruby V.J., Kazmierski W.M. and Knapp R.J., A new type of synthetic peptide library for identifying ligandbinding activity, 1991, Nature vol. 354, str. 82-84; Houghten R.A., Pinilla C., Blondelle S.E., Appel J.R., Dooley C.T. and Cuervo J.H., Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery, 1991, Nature vol. 354 str. 84-86. Touto takzvanou "randomizací" se získá banka neboli knihovna peptidů, jejichž nejrozličnější aktivity jsou předmětem dalšího imunologického testování.

Dosud známý reaktor pro syntézu peptidů s randomizací je tvořen trubicí, nasazenou na kruhovém tělese, po jehož obvodu jsou vytvořeny komůrky s pevným nosičem, z nichž každá je ze spodní strany opatřena fritou s výpustným kanálkem a dalším nezbytným příslušenstvím. Trubice je uzavřena hlavou s přívody roztoků aminokyselin, rozpouštědel a činidel. Randomizačního procesu se v tomto reaktoru dosahuje proudem inertního plynu, přiváděného do vnitřního prostoru, který způsobí vzájemné promísení obsahu všech komůrek. V tomto reaktoru je však možno použít jen malého množství polymerního nosiče a tak randomizovat poměrně krátký úsek peptidového řetězce.

Podstata vynálezu

Výše uvedený nedostatek odstraňuje reaktor pro multisekvenční syntézu peptidů s randomizací, který je tvořený nádobou, jejíž dno je opatřeno středovým kuželem, mezi nímž a stěnami nádoby jsou vytvořeny komůrky, ze spodní strany uzavřené fritou, pod níž je vytvořen výpustný kanálek, spojený se sifonem, jehož výstup je připojen přes přepínací ventil jednak k zásobníku inertního plynu, a jednak k nádobě odpadu. Jeho podstata spočívá v tom, že nádoba reaktoru je opatřena pohonem pro otáčení kolem své svislé osy. Stěny nádoby ve své spodní části svírají se svislou osou reaktoru ostrý úhel α v rozmezí od 1° do 89° a v horní části tupý úhel β v rozmezí od 91° do 179° tak, aby byla vytvořena zachytávací kapsa, tvořící randomizační prostor, ve kterém dochází při odstředování k randomizaci. Nad nádobou jsou v její ose nad středovým kuželem a při horní části stěny nádoby umístěny přívody rozpouštědel a činidel.

Přívod rozpouštědel a činidel je umístěn v ose reaktoru nad středovým kuželem a při horní části stěny nádoby.

Reaktor podle vynálezu umožňuje syntézu všech možných peptidů, tvořených kombinací daného počtu různých aminokyselin o dané délce řetězce, a to oběma hlavními metodami Fmoc a Boc. Konstrukce reaktoru umožňuje vedle randomizace i jeho využití pro běžnou vícenásobnou syntézu peptidů.

Přehled obrázků na výkresech

Na přiloženém výkresu je znázorněn reaktor pro multisekvenční syntézu peptidů s randomizací, prováděnou odstředěním kuliček pevného nosiče po každém cyklu syntézy.

Příklady provedení vynálezu

Reaktor pro multisekvenční syntézu peptidů s randomizací je tvořený rotační nádobou 1, jejíž dno 10 je opatřeno středovým kuželem 9. Mezi ním a stěnami 17 nádoby 1 jsou vytvořeny oddělené komůrky 2 s pevným nosičem, ze spoda uzavřené fritou 3. Pod ní je vytvořen výpustný kanálek 16, ústící do společného sifonu 4, jehož výstup je připojen přes přepínací ventil 15 buď k zásobníku 13 inertního plynu, nebo k odpadní nádobě 11, která je spojena se zdrojem 12 vakua. Nad komůrkami 2 jsou umístěny přívody 6 roztoků aminokyselin a aktivačního činidla, spojené se zásobníky 5 a přívody 7 rozpouštědel a činidel, spojené se zásobníky 8. Spodní část stěny 17 rotační nádoby 1 svírá se svislou osou reaktoru ostrý úhel, její horní část pak tupý úhel. Stěna 17 tak vytváří po obvodu reaktoru záchytnou kapsu, t.j. randomizační prostor, ve kterém se při randomizačním procesu udržuje odstředovaná náplň reaktoru. Nádoba 1 je dále opatřena pohonem 14, například krokovým motorem, který umožňuje její rotaci. Počet komůrek 2, oddělených přepážkami, je dán počtem aminokyselin, které mají být variovány a lze jej měnit podle konkrétní potřeby vložením bloků s požadovaným dělením. Také pro různá množství pevného nosiče lze volit blok s vyššími nebo nižšími přepážkami. Pohon 14 je použit při pomalém pohybu pro dávkování promývacích rozpouštědel, a při vysokých otáčkách pro vlastní randomizaci.

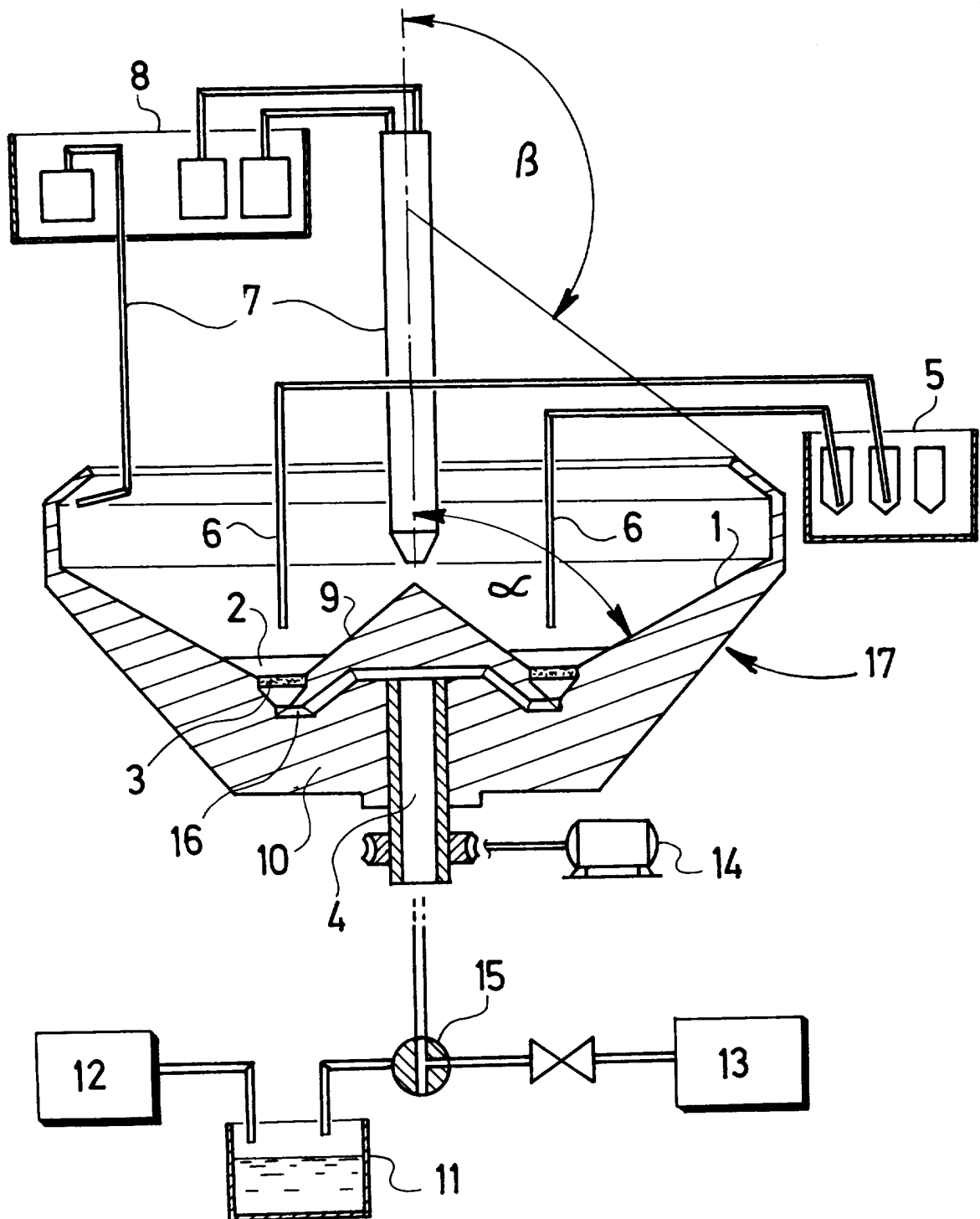
Reaktor je vybaven zařízením k dávkování roztoků aminokyselin, přiváděných ze zásobníků 8 do jednotlivých komůrek 2. Při pomalém otáčení krokového motoru pohonu 14 se plní všechny komůrky 2. Rozpouštědla a činidla jsou z komůrek 2 odsávána vakuem přes sifon 4, umístěný ve středovém kuželu 9, do odpadní nádoby 11. Během reakce, ochrání, promývání i při dalších operacích se obsah jednotlivých komůrek 2 promíchává slabým proudem inertního plynu, přiváděného do spodní části reaktoru sifonem 4 a fritami 3. Tlak plynu je volen tak, aby došlo pouze k promísení obsahu v každé komůrce 2, a nikoliv mezi komůrkami navzájem. V reaktoru je možné použít jako nosiče polymerní pryskyřici. Pokud nejsou použity předem aktivované aminokyseliny, aktivační činidlo se přidává následně, postupně do všech komůrek 2 analogicky, jako je tomu u promývacího rozpouštědla. Do reaktoru je naneseno potřebné množství kuliček syntetické pryskyřice ve vhodném rozpouštědle. Odstředěním vysokou rychlostí jsou kuličky promíchány a rovnoměrně rozděleny po obvodu reaktoru. Snížením otáček nádoby 1 reaktoru suspenze kuliček pryskyřice rovnoměrně steče po stěnách 17 nádoby do jednotlivých komůrek 2. Kuličky pryskyřice, které ulpí na stěně 17 nádoby 1, jsou spláchnuty proudem rozpouštědla z přívodu 7, umístěného při stěně 17 nádoby 1, to vše při pomalém otáčení nádoby 1. Rozpouštědlo se odsaje a po přidání roztoků jednotlivých aminokyselin - v tomto případě se do jedné komůrky 2 přidává vždy stejná aminokyselina - proběhnou reakce. Promývání, ochrání i aktivace probíhá společně shodnými činidly pro všechny aminokyseliny a ve všech komůrkách 2 současně. Po ukončení jednoho cyklu jsou kuličky pevného nosiče vypláchnuty proudem rozpouštědla, přiváděného do rychle se otáčejícího reaktoru, v jeho randomizačním prostoru. Po randomizaci a opláchnutí stěn 17 reaktoru se celý postup opakuje. Dávkování libovolné aminokyseliny do libovolné komůrky 2 je umožněno otáčením nádoby 1 reaktoru. Konstrukce reaktoru zůstává stejná, mění se pouze počet a druh rozpouštědel a činidel. Reaktor umožňuje syntetizovat

peptidy s randomizací využitím principu odstředění, kterým se vytlačuje pryskyřice z reakčního prostoru, tj. ze separovaných komůrek 2 do randomizačního prostoru, vytvořeného po vnitřním obvodu stěny nádoby reaktoru, a jejich statistické rozdělení. Možnost běžné syntézy peptidů spolu s randomizační syntézou ve stejném reaktoru dovoluje automatizovanou přípravu peptidů, které mají randomizovanou pouze část své sekvence. Ve srovnání se známou konstrukcí reaktoru pro automatizovanou přípravu peptidů reaktor podle vynálezu umožňuje řádově vyšší objemové množství polymerního nosiče.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Reaktor pro multisekvenční syntézu peptidů s randomizací, tvořený nádobou, jejíž dno je opatřeno středovým kuželem, mezi nímž a stěnami nádoby jsou vytvořeny komůrky, ze spodní strany uzavřené fritou, pod níž je vytvořen výpustný kanálek, spojený se sifonem, jehož výstup je připojen přes přepínací ventil jednak k zásobníku inertního plynu, a jednak k nádobě odpadu, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nádoba (1), jejíž stěny (17) ve spodní části svírají se svislou osou reaktoru ostrý úhel α v rozmezí od 1° do 89° a v horní části tupý úhel β v rozmezí od 91° do 179° , je opatřena pohonem (14) pro otáčení kolem její svislé osy, přičemž nad nádobou (1) jsou umístěny přívody (7) rozpouštědel a činidel a nad jednotlivými komůrkami přívody (6) roztoků aminokyselin.
2. Reaktor podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že přívod (7) rozpouštědel a činidel je umístěn v ose reaktoru nad středovým kuželem (9) a při horní části stěny (17) nádoby (1).

1 výkres



Konec dokumentu