



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

255089

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 17/08

(22) Přihlášeno 01 07 86

(21) PV 4961-86.A

(40) Zveřejněno 11 06 87

(45) Vydáno 15 09 88

(75)

Autor vynálezu

KRCHŇÁK VIKTOR RNDr. CSc., KROJIDLO MILAN prom. chem. CSC.,
LEPŠA LUDĚK RNDr., PRAHA

(54) Způsob výroby peptidů kontinuální průtokovou metodou v pevné fázi

Řeší se způsob výroby peptidů metodou v pevné fázi v kolonovém uspořádání, jehož podstata spočívá v tom, že polymerní nosič, na kterém postupná výstavba peptidického řetězce probíhá, se umístí do kolony, a ta se promývá veškerými roztoky a rozpouštědly použitými při syntéze tím způsobem, že se mění po jednotlivých cyklech směr promývání. Toto uspořádání znemožňuje ucpávání frity drobnými částmi pryskyřice, neboť změna směru promývání zamezuje usazování drobných částic pryskyřice, které by mohlo snižovat průtok, a zrychluje a zjednodušuje celou syntézu peptidů.

Vynález se týká způsobu výroby peptidů kontinuální průtokovou metodou v pevné fázi.

Syntéza peptidů metodou v pevné fázi doznala v posledních letech neobvyklého rozšíření a v dnešní době se peptidy připravují prakticky výlučně touto metodou. V jejím dnes již klasickém uspořádání se provádějí veškeré reakce na polymerním nosiči, který je umístěn v reakční nádobě a všechny roztoky a rozpouštědla se dávkuje do této nádoby, promíchají s polymerní pryskyřicí a po zvoleném čase se roztok nebo rozpouštědlo odstraní např. odsátím.

Modifikovaný postup, který spočíval v umístění polymerního nosiče do kolony a promývání kolony s nosičem všemi zvolenými roztoky a rozpouštědly, narážel na problém postupného ucpávání spodní frity kolony drbonými částicemi pryskyřice, což vedlo ke snižování průtoku kolonou a k nutnosti zvyšovat neúměrně tlak na kolonu, aby se dosáhlo únosného průtoku. Takovéto syntetizátory vyžadovaly speciální konstrukce, které připomínaly zařízení pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii. Někteří autoři se snažili tento nedostatek odstranit přípravou speciálních polymerních nosičů, které vykazovaly po stránce fyzikálních vlastností zvýšenou odolnost proti drolení.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob výroby peptidů kontinuální průtokovou metodou v pevné fázi, podle vynálezu jehož podstata spočívá v tom že se postupná výstavba peptidického řetězce provádí na polymerním nosiči umístěném v koloně a směr průtoku mobilní fáze se vždy mění po připojení další aminokyseliny.

Způsob podle vynálezu popisuje postup, který nevyžaduje ani speciálních polymerních nosičů ani zvláštního zařízení, které by vyvolávalo vysoké tlaky na kolonu. Do normální skleněné kolony se umístí tolik polystyrenové pryskyřice síťované divinylbenzenem (nejběžněji používaný polymerní nosič pro syntézu peptidů v pevné fázi), aby objem nabobtnalé pryskyřice vyplnil celý objem kolony. Veškeré reakce a promývání, které syntéza peptidů v pevné fázi zahrnuje, se provádějí tím způsobem, že po jednotlivých cyklech se mění směr promývání kolony s polymerním nosičem. Při tomto uspořádání nedochází k postupnému zanášení frity drobnými kousky pryskyřice, neboť tyto jsou umášeny proudem kapaliny střídavě nahoru nebo dolů.

Při vlastním provádění syntézy podle vynálezu se autorům vynálezu osvědčil postup, při kterém jsou zásobní nádoby, které obsahují roztoky a rozpouštědla použité při syntéze, natlakovány na mírný přetlak (20 až 30 kPa) např. dusíkem, a spojovací hadičkou z inertního materiálu, např. teflonu, je tímto přetlakem kolona s polymerním nosičem promývána. Průtok se tak řídí přetlakem plynu. Oba konce kolony jsou napojeny na čtyřcestný ventil, jehož třetí vývod je spojen přes šesticestný ventil se zásobními nádobami a čtvrtý vývod je umístěn do odpadu. Přepínáním čtyřcestného ventilu po jednotlivých cyklech se dosáhne změny směru průtoku kolonou.

Způsob podle vynálezu byl s úspěchem ověřen v praxi. Došlo ke zjednodušení syntézy peptidů, k úspoře surovin a ke zrychlení celé přípravy žádaných peptidů.

Následující příklady provedení způsobu podle vynálezu dokumentují, ale nikterak neomezuji.

P ř í k l a d 1

Do skleněné kolony (2 x 9 cm) se umístí 5g chlormetylované polystyrenové pryskyřice síťované 1% divinylbenzenem a esterifikované Boc-Gly (obsah Gly 0,5 mmol/pryskyřice).

Syntéza peptidu zahrnuje 8 cyklů, sestávajících z následujících kroků: (1) TFA:DCM (1:), 30 min., (2) DCM, do neutrální reakce, (3) TEA:DCM (1:9), 3 min., (4) DCM, do neutrální reakce, (5) předem připravené HOBt estery (5 mmol) v 30 ml DCM:DMF (4:1), (6) DCM, 5 min. Pokud je test na volné aminoskupiny pozitivní, opakovat kroky č. 5 a 6. Každý krok představuje promývání kolony s polymerním nosičem uvedenými roztoky a rozpouštědly přetlakem 20 kPa, aplikovaným do zásobní nádoby s kapalinou.

V jednotlivých cyklech byly kondenzovány následující chráněné aminokyseliny: Boc-Thr(Bzl), Boc-Ser(Bzl), Boc-Thr(Bzl), Boc-Thr(Bzl), Boc-Ser(Bzl), Boc-Ser(Bzl), Boc-Gly, Boc-Pro, Boc-Phe. Po syntéze bylo získáno 7,1 g peptidyl-pryskyřice. Peptidyl-pryskyřice (1 g) byla suspendována ve směsi TFMSA (1,5 ml), TFA (5 ml), tioanisol (2 ml) a míchána 1 h při lab. teplotě. Produkt byl srážen 100 ml absolutního éteru a extrahován do 20% kyseliny octové. Po lyofilizaci byl přečištěn na koloně (1x100 cm) obsahující polyakrylamidový gel, mobilní fáze 1 M kyselina octová. Frakce obsahující jednotky produkt byly spojeny a lyofilizovány. Přečištěný produkt měl vyhovující aminokyselinovou analýzu a choval se jako jednotná látka při chromatografii na tenké vrstvě v soustavě 1-butanol : pyridin : kyselina octová : voda (30:20:6:12) a při papírové elektrofoze v pufru pH 2,5.

Výtěžek: 157 mg Phe-Pro-Gly-Ser-Ser-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly.

P ř í k l a d 2

Do skleněné kolony (2 x 9 cm) bylo umístěno 5 g benzhydrylaminové pryskyřice (polystyrenové) síťované 1% divinylbenzenu (obsah aminoskupin 0,6 mmol/g pryskyřice). Syntéza zahrnovala 3 cykly, které sestávaly ze stejných kroků jako v příkladu 1, s výjimkou prvního cyklu, který začínal krokem č. 3. V jednotlivých cyklech byly kondenzovány následující aminokyseliny: Boc-Gly, Boc-Leu a Boc-Pro. Po syntéze bylo získáno 5,9 g peptidyl-pryskyřice. Peptid byl z peptidyl-pryskyřice /5,9 g/ odštěpen v 60 ml kapalného HF, extrahován do 20% kyseliny octové a lyofilizován. Surový produkt měl vyhovující aminokyselinovou analýzu a na analytické HPLC vykazoval 5 % nečistot /na základě integrace plochy píků při 210 nm/.

Výtěžek: 720 mg Pro-Leu-Gly-NH₂

P o z n á m k a:

Peptidy získané v uvedených příkladech provedení byly syntetizovány způsobem podle vynálezu a to tak, že po každém syntetickém cyklu /tedy vždy po připojení další chráněné aminokyseliny/ byl změněn směr průtoku mobilní fáze a tím nedošlo k zanešení frity úlomky pryskyřice a reakční komponenty se velmi šetrně a přitom dokonale promíchaly. Syntéza peptidů probíhala kontinuálně.

Vysvětlivky ke zkratkám použitým v textu:

Boc	t-butyloxykarbonyl
TFA	kyselina trifluoroctová
DCM	dichlormetan
TEA	triethylamin
HOBt	N-hydroxymenztriazol
DMF	dimethylformamid
Bzl	benzyl
TFMSA	kyselina trifluormetansulfonová
HF	fluorovodík
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
Gly	glycin
Thr	treonin
Ser	serin
Pro	prolin
Phe	fenylalanin
Leu	leucin

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob výroby peptidů kontinuální průtokovou metodou v pevné fázi vyznačující se tím, že se postupná výstavba peptidického řetězce provádí na polymerním nosiči umístěném v koloně a směr průtoku mobilní fáze se vždy mění po připojení další aminokyseliny.