

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998-3178
(22) Přihlášeno: 10.02.1998
(30) Právo přednosti: 11.02.1997 US 1997/037557
(40) Zveřejněno: 11.08.1999
(Věstník č. 08/1999)
(47) Uděleno: 27.01.05
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 16.03.2005
(Věstník č. 3/2005)
(86) PCT číslo: PCT/US1998/002634
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1998/034633

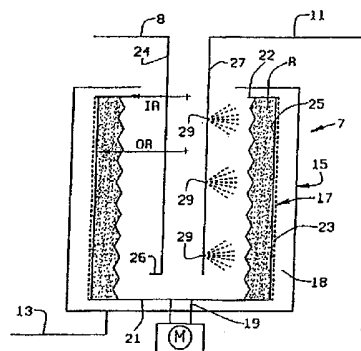
(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. :
A 61 K 38/00
B 01 L 3/00
B 01 J 19/00

- (73) Majitel patentu:
MALLINCKRODT INC., St. Louis, MO, US
- (72) Původce:
Stepaniuk Nicholas, Chesterfield, MO, US
Tomazi Keith, Florissant, MO, US
Stapleton Michael C., Pevely, MO, US
- (74) Zástupce:
PATENTSERVIS Praha a.s., Jivenská 1, Praha 4, 14000

(54) Název vynálezu:
Způsob syntézy peptidu na pevné fázi a reaktorový systém k provádění způsobu

- (57) Anotace:
Je zajištěn reaktorový systém (1) pro syntézu peptidu na pevné fázi a způsob fungování reaktoru. Reaktorový systém (1) obsahuje koš (17) rotující podle osy uvnitř pláště (15) reaktoru (7) a přechovávací nádrž (5), která dodává kapalinu do nebo shromažďuje kapalinu z pláště (15). Koš (17) má porézní boční stěnu (23), na které se formuje polymerní koláč (R) pro peptidovou syntézu. Reaktor (7) a přechovávací nádrž (5) tvoří smyčku nebo okruh, přes který roztoky cirkulují. Cirkulace roztoků chrání reaktor (7) před zaplavením, takže koš (17) nebude ponořen v roztoku, což dovoluje použít méně kapaliny. Tudiž může být použita vyšší koncentrace aminokyselin. Způsob obsahuje vznik polymerního koláče (R) jednotné tloušťky na stěně koše (17) a rozprašování roztoků na polymerní koláč (R), zatímco koš rotuje. Roztoky procházejí přes polymerní koláč (R) a odčerpávají se zpět do přechovávací nádrže (5), pro další cirkulaci nebo recyklaci v systému, nebo pro úplné odstranění ze systému. Předtím než je následující roztok zaveden do reaktorového systému (1), je předchozí roztok vymyt ze systému, aby se zvýšila kontrola expozice peptidu těmito roztoky.



Způsob syntézy peptidu na pevné fázi a reaktorový systém k provádění způsobu

Oblast techniky

Tento vynález se vztahuje k peptidové syntéze na pevné fázi, zvláště k reaktorovému systému, a způsobu použití nového reaktorového systému syntézy na pevné fázi, v kterém může být peptidová syntéza na pevné fázi prováděna ve velkém měřítku se vzrůstajícími objemy výroby a výtěžky oproti těm, které jsou v současnosti dostupné.

Dosavadní stav techniky

Širší použitelnost našeho systému a způsobu oproti jiným reakcím kapalina-pevná fáze zahrnujícím postupnou syntézu na pevných substrátech, takovou jakou je výroba oligonukleotidů, oligodeoxynukleotidů, oligoribonukleotidů, oligosacharidů, proteinů atd. bude jasná těm, kteří se daným stavem techniky zabývají.

Peptidová syntéza na pevné fázi (SPPS) byla vyvinuta Merrifieldem v roce 1963. Základní postup je velmi dobře znám. Způsob SPPS obvykle začíná na polymerním gelu, takovém, jakým je například částečně chlоровaný polystyren, který je prokřížen divinylbenzenem. C-konec chráněné aminokyseliny je na počátku navázán na polymer například za vzniku benzyl esteru aminokyseliny. Mohou být samozřejmě použita i jiná vazebná činidla. Peptid je syntetizován postupně od C-konce přidáváním dalších chráněných aminokyselin. Aminoskupiny a všechny reaktivní funkční skupiny bočních řetězců aminokyselin musí být chráněny stabilními substituenty, aby se předešlo nežádoucím bočním reakcím. Substituenty jsou vybírány tak, že aminoskupiny mohou být odblokovány bez narušení ochrany funkčních skupin bočního řetězce nebo vazby mezi C-koncem a polymerem. Aminoskupiny mohou být chráněny například pomocí boc (t-butoxykarbonyl) nebo fmoc (9-fluorenylmethoxykarbonyl). Peptidová syntéza je obvykle prováděna následujícím způsobem: N-konec peptidu vázaného na polymer (chráněný pomocí boc) je například odblokován roztokem trifluoroctové kyseliny (TFA) v dichlormethanu (DCM). Aminokyselina, která podle sekvence následuje je napojena na peptid vázaný k polymeru za pomoci kondenzačního činidla, takového, jakým je například dicyklohexylkarbodiimid (DCC) v roztoku DCM a dimethylformamidu (DMF). Aktivační činidlo, jako je například 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), může být použito k zlepšení rychlosti a selektivity kondenzační reakce a snížit racemaci. Nezareagovaná aminokyselina, reaktanty a vedlejší produkty reakce jsou odstraněny z polymeru omýváním a filtrací. Proces omývání a filtrace je pak opakován. N-konec peptidu je poté odblokován, další peptid je připojen k řetězci, systém je pak omyt a filtrován atd. Proces je opakován tak dlouho, dokud všechny požadované aminokyseliny nebyly připojeny k peptidovému řetězci v požadovaném pořadí. Zbývající substituenty jsou pak odstraněny z peptidu, peptid je odštěpen od polymeru a shromážděn.

SPPS byla původně prováděna, a často ještě je, v třepaných nebo míchaných baňkách, v kterých je polymer rozptýlen. Pro udržení a míchání polymeru v kapalně fázi systém vyžaduje několikrát větší množství tekutiny, než kolik bude polymer sám absorbovat nebo vázat. Jestliže by tedy polymer zadržoval 10 ml kapaliny, pak by bylo třeba 50 až 100 ml kapaliny pro rozptýlení a udržení polymeru v kapalně fázi. Zvyšující se množství kapaliny vede k používání zředěných roztoků (obvykle 150 mmol aminokyseliny/litr roztoku) z důvodu minimalizace nákladů, protože aminokyseliny jsou drahé. Se zředěnými roztoky je obtížné získat vysokou koncentraci aminokyselin a z tohoto důvodu i rychlou chemickou reakci mezi aminokyselinami a rostoucím řetězcem. Kromě toho, když je polymer omýván a filtrován (v baňce) stylem vsádkového roztoku je fakticky nemožné, při omezeném počtu omytí vsádky, odstranit z polymeru všechny použité roztoky DCM a TFA. Výsledkem je, že čas styku peptidového řetězce s DCM a TFA nemůže být přesně kontrolován.

Počet navržených typů ve vývoji reaktorů pro peptidovou syntézu je jedinečný. Polymer používaný jako pevná fáze je obvykle gelový polymer s nízkým stupněm prokřížení. Tyto polymery v některých rozpouštědlech bobtnají (v takových jako je DCM) a v jiných rozpouštědlech se smršťují (v takových jako je methanol). Objem polymeru také tihne k zvětšování se s růstem
 5 délky peptidového řetězce. Kromě toho tyto polymery tihnou k tomu být ve své podstatě dosti měkké a tudíž jsou citlivé k fyzikálnímu opotřebování. Je požadován reaktor vyhovující těmto charakteristikám. Délka expozičního času mezi polymerem s vázaným peptidem a rozpouštědly a reaktanty užívanými při syntéze může být také velmi důležitá. Odblokování peptidu vázaného na polymer musí být úplné, aby byl získán nejvyšší výtěžek, ale tímto vzniklé karbokationty nesmí
 10 zůstat v kontaktu s peptidem, protože by se mohly vyskytnout nežádoucí boční reakce.

Bohužel čas požadovaný k odčerpání roztoku z polymerní polotekuté disperze se zvyšuje s tloušťkou polymerové vrstvy vzniklé během filtrace. Následkem toho expoziční čas peptidu vázaného na polymer s karbokationty se zvyšuje tak, jak se zvyšuje tloušťka vrstvy polymeru.
 15 Výsledkem je, že filtrační časy pro reakce v řádech kilogramů jsou daleko delší, než tyto časy porovnané s časy stolních reakcí, takže riziko zničení peptidů z důvodu reakcí s karbokationty se zvyšuje s velikostí vsádky. Reaktory větších rozměrů musí být proto navrhovány takovým způsobem, aby se minimalizovala doba filtrace. Několik řešení tohoto problému může být vybráno podle typu reaktorové konstrukce a podle vlastností částic polymeru, které konstrukce reaktoru
 20 povoluje.

Aby chemická reakce probíhala, musí být reakční složky přítomny v reakčním místě uvnitř kuliček. Reakce, jichž se týká vazebný krok, mohou být limitovány rychlostí, kterou reaktanty (DCC a intermediáty z objemové kapalně fáze reaktoru, v němž dochází ke vzniku vazby) pronikající skrz povrch a póry polymeru do vnitřních reakčních míst. Jak je známo, polymer, což je
 25 obvykle polystyrenová pryskyřice, je účinně tvořen porézními kuličkami. První aminokyselina vytvářeného peptidového řetězce je vázána na vnitřní místa matrice polymeru. Peptidový řetězec pak začíná růst v těchto místech, podle toho jak reakční složky do těchto míst přicházejí.

Rychlost přestupu hmoty reaktantů z objemu kapalně fáze na místa uvnitř polymeru je úměrná koncentračnímu gradientu násobenému difúzním koeficientem látky v rozpouštědle (Fickův zákon), ale je vhodné uvažovat o přestupu hmoty v termínech odporů. Odpor k přestupu hmoty v heterogenních procesech, kapalina-pevná látka, je zřejmý na dvou místech: (1) přes nehybnou kapalinovou vrstvu na povrchu částice polymeru a (2) uvnitř pórů polymerové částice. Zvýšení
 35 rychlosti tekutiny vzhledem k polymeru snižuje odpor vrstvy. Pro snížení odporu přestupu hmoty uvnitř polymeru jsou vhodnější malé polymerové kuličky, které jsou ve stavu gelu (to je 5 až 100 μm). Použití gelovatějších polymerů může umožnit kapacity, které převyšují 1 mmol aktivních míst (nebo peptidových řetězců)/g polymeru a blíží se k 2 až 4 mmol/g při vysokých výtěžcích a konverzi. Při použití malých částic polymeru se také očekává ulehčení lepšího, rychlejšího a úplnějšího omytí polymeru, protože bude jednodušší uskutečnit výměnu mezi
 40 maticí polymeru a promývacím rozpouštědlem. Kromě toho mají polymerové kuličky raději menší počet prokřížení kvůli zpřístupnění jejich pórů. Nicméně nějaké prokřížení je v polymeru nezbytné z důvodu udržení tvaru a dodání pevnosti polymerovým kuličkám. Kuličky polymeru se stupněm prokřížení mezi 0,2 % a 1 % by měly být dostačující.

U syntetizačních způsobů, kde jsou aminokyseliny aktivovány dicyklohexylkarbodiimidem (DCC), může být odpor k difuzi do jádra polymeru značně zvýšen vznikem dicyklohexylmočoviny (DCU), která je v podstatě nerozpustná v 50% DMF v DCM používaném během vazebné reakce. Na polymeru může vzniknout skořápka nerozpustné DCU. Tato vrstva DCU
 50 brání reaktantům a promývacím roztokům v přestupu mezi povrchem a jádrem polymerové kuličky. V extrémních případech může dojít k tomu, že difuze z objemu kapalně fáze k volným aminoskupinám je nemožná, a že pouze boc-aminokyselina vhodná pro vazebnou reakci je tou látkou, která je zpočátku přítomna uvnitř polymeru před přidavkem DCC.

Difuze reaktantů do polymeru může být také bržděna vznikem vlastních peptidových řetězců. Je obecně známo, že heterogenní reakce v porézních částicích typicky rostou paprskovitě dovnitř v závislosti na vnějším povrchu částice. Je proto rozumné použít toto pro syntézy na pevné fázi. Kulička tak vhodně zahrnuje rostoucí skořápku reagujícího peptidu a zmenšující se nezreagované jádro. Jestliže rychlost reakce mezi volnými aminoskupinami a aktivovaným intermedie-
 5 probíhá rychle vzhledem k rychlosti difuze přes póry polymeru, pak skořápka reagujícího peptidu, a eventuálně DCU, bude růst paprskovitě dovnitř od povrchu částice. Reakce bude probíhat nad povrchem zmenšujícího se jádra uvnitř kuličky polymeru. Reaktanty tedy proto musí difundovat přes stále se více zesilující vrstvu peptidu a DCU, aby dosáhly nezreagovaného jádra
 10 kuliček polymeru.

Jedním řešením srážení DCU je změna v chemizmu reakčního systému. Odpor k difuzi přes póry blokové DCU může být snížen nebo odstraněn vytvořením symetrického anhydridu, o-acylisourei, a HOBt aktivního esteru v odděleném reaktoru (to jest preaktivované aminokyseliny)
 15 a filtrováním DCU z roztoku před zavedením do hlavního reaktoru, kde je prováděna syntéza. Podobného prospěchu může být dosaženo, jestliže jsou použita odlišná vazebná činidla (takové jako je DIC), která netvoří nerozpustné produkty během vazebné reakce.

Kromě snížení blokování, které způsobuje vznik nerozpustných sloučenin, jako je DCU, mohou
 20 být omezení difuze přes póry redukována použitím menších částic. Výsledkem klesajícího odporu přestupu hmoty je to, že budou požadovány nižší koncentrace reaktantů pro dosažení stejné reakční rychlosti. To může významně redukovat spotřebu aminokyselin, HOBt a DCC potřebných pro výrobu 1 gramu produktu.

Číselná analýza difuze do a přes částici je ukázána na obrázcích 3 a 4. Koncentrace reaktantů bude vyšší na povrchu částice a koncentrace reaktantů uvnitř částice se bude zvyšovat v čase, tak jak reaktanty difundují nebo přecházejí do polymerní částice. Obrázky 3 a 4 ukazují, že stupeň koncentrace vytvořený v čase (τ) závisí na koeficientu přestupu hmoty (H) přes vrstvu na povrchu polymerní částice a relativní vzdálenosti zeta = (r/R) skrz částici, ve které je koncentrace měřena, a kde R je celkový poloměr částice (rozměr částice) a r je bod odměřený od středu
 30 částice. Tedy $r/R = 1$ na povrchu částice a $r/R = 0$ ve středu částice. Každá ze čtyř křivek na obrázku 3 představuje koncentrační profil v daném čase τ , když na povrchu částice není odpor vrstvy ($H = \infty$).

Na obrázku 4 jsou dvě křivky podobného tvaru, jako na obrázku 3, ale pouze tam, kde odpor k přestupu hmoty přes vrstvu na povrchu částice je vzrůstající (H se snižuje). V porovnání se dvěma křivkami na obrázku 4 ($H = 1$ a $H = 3$) může být pozorováno, že koncentrace uvnitř částice vzrůstá mnohem rychleji s nižším odporem vrstvy na povrchu částice (H je vyšší).

Obrázky 3 a 4 ukazují, že při významném odporu (obou, odporu na povrchu i v pórech částice) se koncentrace uvnitř částice vytváří pomaleji. To naznačuje potřebu snížit oba, jak vnitřní odpor v pórech, tak vnější odpor povrchové vrstvy, a tak by mohlo dojít ke zvýšení přestupu hmoty reaktantů do a přes částici. Přenos hmoty reaktantů k volným amino skupinám vázaným na polymer může být zesílen zvýšením koncentrace reaktantů v kapalně fázi a snížením délky pórů
 45 (použitím polymerních částic s menším průměrem). Kromě toho odpor přestupu hmoty přes vrstvu může být snížen zvýšením rychlosti objemové tekutiny ve vztahu k polymerním částicím, protože koeficienty vrstvy pro kulovitá tělesa jsou funkcí rychlosti tekutiny. Konstrukce reaktoru, která by se zaměřovala na tyto difuzní problémy zároveň není v současnosti k dispozici.

Od počátečního vývoje syntézy na pevné fázi (SPPS) Merrifieldem v roce 1963 byla uskutečněna řada inovací týkajících se konstrukce reaktoru pro peptidovou syntézu. Dřívější reaktory byly založeny na principu třepaných baněk, zatímco pozdější konstrukce reaktorů se skládaly z míchaných nádržových reaktorů, centrifugačních reaktorů a trubkových reaktorů. Všechny tyto typy reaktorů pracují s kuličkami polymeru držnými nebo potopenými v kapalně fázi. Míchané nádržové reaktory (STR's) jsou obecně používány pro syntézu peptidů, ale trpí jistými omeze-
 50
 55

ními. Protože kuličky jsou v disperzi, tak možnosti zvýšit rychlost kapaliny vzhledem k částicím v míchaném nádržovém reaktoru jsou krajně omezené. Je to proto, že setrvačné a viskózní síly působí prostřednictvím pohybující se kapaliny na dispergované částice tak, že částice tíhnou k tomu, být vlečeny spolu s kapalinou. Rychlostní pole kapaliny ve vztahu k částicím může být
 5 nicméně jednoduše zvyšováno v reaktorech obalených lůžkem, v kterých částice polymeru zůstávají uchyceny, ale kapalina je tlačena přes lůžko polymeru. Nicméně fritu na dně obou, míchaných nádržových reaktorů a reaktorů obalených lůžkem vyžadujících filtrování kapalné fáze z polymeru, musí být schopna odolat rozdílným tlakům nezbytným pro filtraci. Jak se
 10 zvětšuje velikost reaktoru, fritu musí být konstruována z postupně se zesilujících materiálů, aby se vyhnulo mechanickému selhání. Na druhé straně, pokud průměr reaktoru zůstává konstantní, pak se tloušťka vrstvy polymeru zvětšuje úměrně tomu, jak roste velikost vsádky. Zvětšená tloušťka vrstvy polymeru způsobuje postupné prodlužování odvodňovacích a filtračních časů a také expozičních časů mezi peptidem navázaným na polymeru a reaktanty, reaktivními inter-
 15 mediáty a rozpouštědly. Z těchto důvodů ani míchaný nádržový reaktor se zabudovaným filtrem ani reaktor obalený lůžkem nepředstavují nejvýkonnější typ reaktoru pro velkoobjemový (v řádech kilogramů) SPPS proces.

Ačkoliv změny ve velikosti částic v průběhu reakce vedly k některým konstrukčním obtížím, trubkové reaktory, takové jako reaktory obalené lůžkem, stále nabízejí některé výhody oproti
 20 jiným reaktorům. Reaktory obalené lůžkem umožňují přistupovat k promývání jako k nahrazovací operaci, spíše než jako k zředovací operaci, jak je tomu u STR, za předpokladu, že velikost „mrtvého objemu“ mezi vstupem do reaktoru a kuličkami polymeru je minimalizována. Reynoldsovo číslo (Re) může být u trubkových reaktorů velmi vysoké, jestliže je vysoká rychlost kapaliny vůči kuličkám polymeru. Ale vysoké průtokové rychlosti vytváří vysoké tlaky uvnitř
 25 reaktoru a vysoké tlaky mohou mít škodlivý vliv na polymer. Nicméně, protože koeficienty přestupu hmoty se zvyšují se vzrůstajícími Reynoldsovými čísly, tak trubkové reaktory mohou mít nižší odpor vrstvy k přestupu hmoty než míchané nádržové disperzní reaktory.

Ale použití reaktorů obalených lůžkem má také vlastní řadu problémů. Polymer může zvětšit svou původní velikost třikrát, když je omýván DCM a může se zmenšit na jednu třetinu původní velikosti, když je omýván methanolem. To může způsobit celkově devětkrát změnu v celém
 30 objemu polymerního lůžka. Odstranění nebo minimalizaci mrtvého objemu je proto velmi obtížné provést. Reaktor obalený lůžkem, který má výšku mnohem větší než průměr, má významnou velikost plochy povrchu stěny, která brání expanzi a smršťování polymerního lůžka. Když polymerní lůžko expanduje, působí to proti stěnám nádoby a redukuje prázdný prostor mezi
 35 částicemi polymeru. Je tak potřeba vysoký tlak na protlačení omývacího roztoku přes lůžko za požadovaný časový interval. Tento vysoký tlak může poničit kuličky polymeru, vytvořit jemné částice, které mohou zablokovat filtr a případně poničit nebo zlomit filtrační fritu. Jestliže není použit vysoký tlak, pak průtok přes lůžko bude moc pomalý, což umožní peptidům reagovat delší
 40 čas a může dojít k vedlejším reakcím. Některé vazebné kroky aminokyselin nebo peptidů jsou velmi citlivé na reakční dobu. Například arginin může sám zreagovat za vzniku cyklické struktury místo navázání se na peptidový řetězec. Expoziční čas se proto může stát velmi důležitým faktorem.

45 Bylo provedeno několik pokusů zkonstruovat trubkový reaktor, který by překonal omezení kladená polymerem. Tyto dřívější pokusy zahrnují:

(1) Ignorování problémů se zvětšováním polymeru. Verlunder, et al., Patent US 4 192 798 odhaluje přístupy, ve kterých pokles tlaku v reaktoru je nejméně 1,4 MPa a více než 70 MPa
 50 nebo více. Nárokuje kvantitativní výsledky a ty reakce, které trvají hodiny, zatímco v jiných reaktorech byly dokončeny za minuty. Obtíže s tímto typem reaktoru zahrnují degradaci polymeru, blokaci frity na výstupu, udržování stejného osového průtoku v celé koloně na zvýšené hodnotě, neúčinnosti při omývání jako výsledek vlivu mrtvého objemu a cena kolony a vysoko-
 55 tlaké pumpy. Tento typ reaktoru je základně průmyslově označován HPLC.

(2) Povolení osově expanze v koloně. Baru, et al., WO 88/909010.6, SU 4117080 vyvinul reaktor s nulovým mrtvým objemem, v kterém jeden konec reaktoru směl splývat s polymerem. Malá zátěž byla vložena na vrchní píst reaktoru, aby se zajistila konstantní síla působící na volnou hlavu reaktoru. Výsledkem bylo, že kolona byla provozována za nižšího poklesu tlaku, aby se vyhnulo přetékání rozpouštědla ven kolem horní hlavy reaktoru, což dělalo systém citlivý k blokadě frity na výstupu. Akumulace DCU v lůžku nebo uvnitř frity může zvýšit pokles tlaku a mohla by mít následky pro bezpečnost a okolní prostředí. Kromě toho nuceně udržování nízkého poklesu tlaku vyžaduje nízkou rychlost kapaliny, což se projevuje malými hodnotami Reynoldsových čísel a špatnou distribucí průtoku kapaliny. Nízké rychlosti průtoku kapaliny způsobují také delší expoziční časy reaktantů a omývacích roztoků.

(3) Použití rigidního polymeru na podporu gelu. Atherton, et al., JCS Chemical Communications, p. 1151 [1981], vyvinul rigidní polymer, ve kterém by mohl být v makropórech obsažen gelový polymer. Gelový polymer by se mohl zvětšovat a zmenšovat, ale objem rigidních polymerních kuliček by zůstal konstantní. Jako výsledek by mohly být získány vysoké průtokové rychlosti kapaliny, nízké poklesy tlaku a konstantní objem polymeru. Nicméně je pravděpodobnější, že dojde ke snížení přestupu hmoty v takto podporovaných typech polymerů, protože by se prodloužila difuzní cesta reaktantů po připojení vrstvy filmu a difuze přes póry rigidního polymeru. Navíc jsou tyto typy polymerů drahé.

(4) Ohled na mrtvý objem. Lapluye a Poisson, PCT publication no. WO 92/115867 vyvinuli pístový typ reaktoru s fritami na obou koncích. V tomto typu reaktoru je polymer umístěn v dutém pístu, který se pohybuje nahoru a dolů uvnitř velkého válce, který je plný rozpouštědla a reaktantů. Tento typ reaktoru je v základu podobný míchanému reaktoru nebo reaktoru s tekutým lůžkem a míchací pohyb pístového reaktoru by měl vyrovnat odlišnosti v hustotě polymeru a rozpouštědel. Jeví se, že účinnost omývání by měla být stejná nebo trochu lepší než v případě menších objemů kapalně fáze u STR. Nicméně objem rozpouštědla použitého vzhledem k hmotě polymeru je pravděpodobně značně větší než vyžaduje typický trubkový reaktor. Reynoldsova čísla jsou pravděpodobně docela nízká a může být obtížné zvětšit mechanismus. Kromě toho může docházet k vývoji tepla, jako výsledku vlivů „viskózního rozptýlení“ způsobených pohybem pístu v kapalině, což vyžaduje některé přídatné chladičí prostředky.

Z tohoto pohledu neexistuje trubkový reaktor, který by neměl nějaká vážná omezení v ceně, bezpečnosti nebo účinnosti.

Reaktory založené na principu rotující mísy byly také vyvinuty. Rotující mísy nebo centrifugační reaktory mohou brát v úvahu zvyšující rychlost kapaliny vzhledem k částicím polymeru. Birr, German Patent 2 017 351, ukazuje „pračkový“ reaktor, v kterém je porézní koš na počátku naplněn polymerem, a poté vířen mírnou rychlostí zatímco je zaplavován kapalinou. Odstředivé síly způsobují, že částice polymeru vytváří lůžko na vnitřních stěnách koše a také jejich vlivem vzniká mírný stupeň recirkulace kapaliny přes lůžko polymeru. Mísa je zaplavena (to jest naplněná tekutinou), tak jako je zaplaveno polymerní lůžko. Brzda vložená na koš kapalinovou lázní vkládá velkou kroutivou sílu na pohonnou jednotku a bude také způsobovat vznik tepla. Z těchto důvodů bude rotační rychlost Birrova reaktoru relativně nízká a vzájemná rychlost kapaliny vůči pevné fázi bude omezena. Omezení kladená na rotační rychlost budou téměř jistě vést ke vzniku nejednotného polymerního lůžka, který bude na vrcholu mělké a hluboké v blízkosti dna. Recirkulující kapalina bude mít sklon jít cestou nejmenšího odporu a tak vznikne „zkrat“ přes mělkou část polymerního lůžka. Výsledkem je, že kontakt mezi kapalinou bohatou na reaktanty a polymerem nebude shodný v celém reaktoru. Kromě toho nižší rychlost kapaliny s ohledem na polymer bude způsobovat nižší přenos hmoty přes povrch vrstvy, která obklopuje částice. Nakonec objem rozpouštědla nezbytného k zaplavení rotujícího koše bude velký v porovnání s objemem potřebným k nasáknutí polymerní náplně. To tedy bude také vyžadovat významný objem reaktantů vzhledem k hmotě polymeru. Větší objem bude mít za následek použití méně koncentrovaného roztoku, který se následně projeví nižší reakční rychlostí a delším reakčním

časem. To proto může vyžadovat větší množství aminokyseliny, aby byla udržena koncentrace aminokyseliny na takové úrovni, která zajistí přijatelné reakční rychlosti.

Jiný typ centrifugačního reaktoru založeného na principu zaplaveného „dutého rotoru“ byl vyvinut Andersonem a Andersonem, Patent US 5 186 824. Cesta, kterou kapalina protéká reaktorem (Anderson et al.) je spíše osová než paprskovitá a geometrie je pro kapalinová průtoková pole nepravidelná. To, která kapalina je uvedena závisí na hustotě kapaliny ve vztahu k hustotě nejnověji přidané kapaliny. Pro expanzi polymeru je také zajištěn malý prostor. Výsledkem expanze a smršťování je, že expozice polymeru v kapalně fázi je pravděpodobně nejednotná. Kompletní a jednotný kontakt a odstranění kapaliny z rotoru by možná bylo velmi obtížné provést.

Rychlost, při které průtok může procházet přes polymer a filtrační tkaninu, je funkcí odporu (K_p) polymeru k průchodu kapaliny polymer a odporu (B) filtrační tkaniny k průchodu kapaliny přes tkaninu. K_p a B jsou vypočítány podle následujících rovnic:

$$K_p = \frac{-\mu \alpha C_s}{A^2 \Delta P} \quad \text{a} \quad B = \frac{-\mu R_m}{A \Delta P}, \quad \text{kde} \quad 1$$

μ = viskozita kapaliny;

C_s = koncentrace pevných částic v kapalině;

20

A = plocha filtrace, která se rovná ploše filtrační tkaniny použité v koši;

ΔP = pokles tlaku přes polymerní lůžko;

25 α = specifický odpor vrstvy (polymeru) k průchodu roztoku přes polymer (v m/kg), který je funkcí poréznosti;

R_m = odpor filtrační tkaniny k průtoku roztoku přes tkaninu.

30 Síly působící na těleso v centrifuze mohou být popsány následujícími rovnicemi. Zrychlení a předmětu v centrifuze o poloměru R , která se otáčí úhlovou rychlostí ω rad/s, může být získáno z následující rovnice:

$$a = R\omega^2 \quad 2$$

35 Horní rovnice může být vyjádřena v jednotkách gravitačního zrychlení vydělením zrychlení zrychlením jako výsledku tíhy (980 cm/s^2).

Pokles tlaku přes lůžko polymeru může být získán následujícím způsobem. Statický tlak působící na tekutinu je vyjádřený rovnicí:

$$dP = \rho g dz \quad 3$$

40 kde P je tlak, g gravitační síla a z je výška tekutiny. Výsledkem substituce rovnice 2 pro gravitační zrychlení v rovnici 3 je:

$$dP = \rho \omega^2 R dz \quad 4$$

Výsledkem integrace mezi vnitřním a vnějším poloměrem tloušťky polymerního lůžka je následující vyjádření:

$$P_i - P_0 = \frac{\rho \omega^2 (R_i^2 - R_0^2)}{2} \quad 5$$

Horní rovnice mohou být vyjádřeny vhodnějšími výrazy (otáčky za minutu), než v radiánech za sekundu, následujícím převodem:

$$\omega [\text{rad / sec}] = \frac{2\pi N [\text{rev / min}]}{60 [\text{sec / min}]} \quad 6$$

- 5 Pokles tlaku přes porézní prostředky může být vyjádřen následující rovnicí:

$$P_i - P_0 = q\mu \frac{m_c \alpha}{A^2} + \frac{R_m}{A} \quad 7$$

10 kde q je objemová průtoková rychlost kapaliny, μ viskozita kapaliny, m_c je hmotnost vrstvy, α je specifický odpor vrstvy vůči průtoku, R_m je odpor filtračního prostředku vůči průtoku a A je filtrační plocha. Odpor vrstvy α může být funkcí tlaku, jestliže se vrstva stlačuje. Konstanty pro odpory vrstvy a filtračních prostředků mohou být získány provedením vsádkového filtračního experimentu za konstantního tlaku a rozdělením času, který uplyne, a jehož dělení je provedeno podle objemu jednotlivých podílů celkového objemu filtrátu. Sklon výsledné křivky je úměrný odporu vrstvy a průsečík je úměrný odporu filtračních prostředků.

15

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je způsob syntézy peptidu na pevné fázi v reaktorovém systému 1, vyznačující se tím, že reaktorový systém 1 obsahuje reaktor 7 pro syntézu, který má plášť 15, koš 17 na obr. 2 umístěný v plášti 15, opatřený porézní stěnou 23 a rotující kolem osy požadovanou rotační rychlostí, s menším průměrem než plášť 15, koš 17 a plášť 15 vymezují prostor 18 mezi vnějším povrchem koše 17 a vnitřním povrchem pláště 15; způsob zahrnuje následující kroky: (a) suspenze polymeru se dodá do rotujícího reaktorového koše 17, aby došlo k vytvoření koláče R na obr. 2 jednotné tloušťky na stěně koše 17, (b) deblokační roztok se dodá do rotujícího koše 17, aby došlo k odblokování N-konce peptidu vázaného na polymer; (c) jeden nebo více vymývacích roztoků se dodá do rotujícího koše 17, aby došlo k vymytí deblokačního roztoku z koláče; (c) roztok následující aminokyseliny, která má být připojena k peptidovému řetězci, a vazebné činidlo se dodá do rotujícího koše 17, aby došlo k připojení následující aminokyseliny k peptidovému řetězci; kroky (c) – (d) se opakují, dokud není peptidový řetězec kompletní; deblokační roztok, omývací roztok, roztok aminokyseliny a roztok vazebného činidla se zavádějí do rotujícího koše takovou rychlostí, aby se dodávané roztoky nehromadily v plášti 15 na obr. 2 reaktoru a zaplavovaly koš 17, koš 17 je v nezaplaveném stavu během každého kroku syntézy peptidu. Jedním cílem předkládaného vynálezu je zajistit způsob provádění SPPS, který bude produkovat vyšší výstupy a vyšší výtěžky než je v současnosti možné.

35

Jiným cílem je zajistit takový způsob, při kterém by čas kontaktu peptidového řetězce s různými činidly mohl být přesně kontrolován.

40

Dalším cílem je zajistit takový způsob, při kterém se reakční rychlost zvyšuje.

Dalším cílem je zajistit takový způsob, který bude dovolovat použití vyšších koncentrací aminokyseliny než je v současnosti možné bez zvyšování množství použité aminokyseliny (a eventuálně použití vyšších koncentrací s menším množstvím aminokyselin).

Dalším cílem je zajistit reaktor pro takový způsob.

Dalším cílem je zajistit takový reaktor, v kterém se přenos hmoty kapaliny přes pevnou fázi zvyšuje.

5

Dalším cílem je zajistit takový reaktor, který nebude bránit bobtnání a smršťování polymeru, a který nebude způsobovat opotřebovávání polymeru.

10

Dalším cílem je zajistit takový reaktor, v kterém je polymerní koláč skutečně rovnoměrný v tloušťce tak, že průtok kapaliny přes polymer je rovnoměrný.

Dalším cílem je zajistit takový reaktorový systém, který může redukovat plýtvání rozpouštědlem.

15

Dalším cílem je zajistit takový reaktor, který má schopnost „vymáchat“ rozpouštědlo z polymeru pomocí odstředivé síly, čehož výsledkem je eliminování kroku chemického smršťování polymerních částic alkoholem, protože chemického smršťování polymeru může způsobit shluknutí narůstajícího řetězce a může poškodit polymer.

20

Dalším cílem je umožnit širší výběr polymerů mající odlišnou velikost částic a vlastnosti prokřížení, které jsou výhodné pro utváření peptidů.

Tyto a další cíle budou zřejmé těm, kteří se daným stavem techniky zabývají ve světle následujících návrhů a doprovázejících odhalení.

25

Ve shodě s vynálezem, obecně uvedeným, jsme zajistili reaktorový systém a způsob ovládání systému, který dosahuje výše uvedených cílů. Reaktorový systém zahrnuje reaktor mající plášť a rotující koš namontovaný uvnitř tohoto pláště. Koš má perforovanou, porézní nebo dírkovanou boční stěnu, na které se tvoří vrstva polymeru během syntetizačního procesu. Filtrační tkanina nebo stěna je umístěna na vnitřním povrchu stěny koše a vrstva polymeru se vytváří na filtrační tkanině. Systém také obsahuje zásobní nádrž na roztok nebo přechovávací nádrž, která přijímá roztoky později zaváděné do reaktoru. Zásobní nádrž na roztok obsahuje vstupní otvor a výstupní otvor. Zásobní nádrž na roztok a reaktor jsou propojeny tak, aby se vytvořila smyčka nebo obvod, přes který je roztok cirkulován. Reaktorový systém funguje tak, že reaktorový koš není ponořen v roztoku. Tudíž reaktor není nikdy zaplaven roztokem a všechny roztoky prochází přes vrstvu polymeru.

30

35

Systém obsahuje čisticí systém mající lapač odpadu a ventily, které jsou v potrubích propojících reaktor a zásobní nádrž. Ventily odstraňující se systému první roztok a posílají ho přímo do odpadu dříve než je zaveden do systému druhý roztok. Čisticí systém se skládá z prvního ventilu, který je v potrubí spojujícím výstup zásobní nádrže se vstupním otvorem reaktoru a druhý ventil, který je v potrubí spojujícím výstup z reaktoru se vstupním otvorem do zásobní nádrže. První ventil posílá první roztok do odpadu potom co je dokončen cyklus prvního roztoku a před tím než je zaveden druhý roztok do zásobní nádrže. Druhý ventil posílá cirkulující roztok do odpadu na krátký čas na začátku cirkulace druhého roztoku, aby se zabránilo zbytkům prvního roztoku, který mohl zůstat v polymerním lůžku, ve vstupu do zásobní nádrže, která nyní obsahuje druhý roztok.

45

50

Výhodněji obsahuje reaktorový systém také přípravou nádrž, v které jsou roztoky připravovány (to znamená, že jsou zde preaktivovány aminokyseliny, je zde připravován polymer, atd.). Tato přípravná nádrž je propojena potrubím s reaktorem a se zásobní nádrží na roztok. Ventil je schopen selektivně poslat obsah přípravné nádrže do zásobní nádrže na roztok a do reaktoru. Ventil z přípravné nádrže posílá připravený polymer přímo do reaktoru a roztoky aminokyselin, omývacích roztoků atd. do zásobní nádrže. Mezi přípravou nádrží a zásobní nádrží je umístěn filtr, přes který prochází roztoky preaktivovaných aminokyselin. Filtr zajišťuje odfiltrování

nerozpustných vedlejších produktů aktivační reakce (takových jako je DCU). Tato filtrační cesta je zajištěna tak, že omývací roztoky, deblokační činidla atd. nemohou projít přes filtr.

5 Způsob řízení systému zahrnuje (a) otáčení koše při požadované rotační rychlosti a dodávání aktivovaného polymeru do reaktorového koše tak, aby se vytvořila vrstva skutečně jednotné
tloušťky (například přibližně od 2 cm do 5 cm silná) na perforované stěně koše. Polymer výhodněji obsahuje první aminokyselinu vázanou na polymer nebo je jinak odvozen. Jestliže první
10 aminokyselina není navázána na polymer, pak je navázána na polymer nyní. (b) Dodání deblokačního roztoku do rotujícího koše, aby byl odblokován N-konec peptidu vázaného na polymer. (c) Dodání omývacího roztoku do rotujícího koše, aby byl vymyt deblokační roztok
z vrstvy polymeru. (d) Dodání roztoku následující aminokyseliny, aby byla připojena k peptidovému řetězci, a vazebného roztoku do rotujícího koše, aby přispěl k připojení následující
aminokyseliny k peptidovému řetězci. Kroky (b) – (d) jsou opakovány, dokud není peptidový
15 řetězec dokončen.

Roztoky (to znamená deblokační roztok, omývací roztok, roztok aminokyseliny a roztok vazebného činidla) jsou zaváděny do rotujícího koše takovou rychlostí, že dodávaný roztok nebude
bržděn v prostoru reaktoru v místě nad patrem koše, takže všechny roztoky nebude zabrzděn
20 v prostoru reaktoru okolo koše. Tudíž koš je v nezaplaveném stavu během každého stupně peptidové syntézy. Použité kuličky jsou tvořeny polystyrenem kuličkami, mají průměr menší než 100 μm a jsou zesítovány až 1,5 %. Malá velikost kuličky a nízké procento zesítování uvnitř
kuličky usnadní přenos hmoty přes kuličky a tím umožní, aby rychlost reakce byla tak vysoká,
jak jen je možné. Větší kuličky polymeru mohou také být použity v tomto systému, ale pak
25 vznikne větší odpor k přestupu hmoty.

Aby koš mohl fungovat v nezaplaveném stavu, většina roztoku je udržována ve vnější sběrné nádrži a roztok je pak pumpován do reaktoru tak, aby prošel vrstvou a pak se vrátil do sběrné
nádrže. Roztok je poté recyklován přes polymerní koláč předurčeným časovým intervalem. To
30 zajišťuje kontakt na tak dlouho, jak je potřeba.

Mezi každým krokem (to znamená před zavedením dalšího nebo druhého roztoku) je předešlý
nebo první roztok odčerpán a vyčištěn ze systému, aby se zabránilo prvnímu roztoku v kontaktu
s polymerem v delším časovém intervalu než je požadováno. Odvodňovací krok je po recyklo-
vání roztoku zastaven, pokračuje otáčení koše, aby se zjistilo, že téměř všechny volný odvodňo-
vaný roztok je vytlačen ven z vrstvy působením odstředivých sil a navrácen do zásobní nádrže.
35 Čistící krok se týká činnosti prvního ventilu, který posílá roztok do sběrné nádrže k obnově nebo do odpadu.

Malé množství prvního roztoku může zůstat v polymeru na počátku druhého cyklu. Když je
40 druhý roztok zaveden do systému, tak je druhý ventil otevřen do odpadu na krátký časový úsek na počátku cyklu druhého roztoku. Zbytek prvního roztoku, který nebyl vytlačen pryč z vrstvy, bude vytlačen nebo vymyt ven z vrstvy druhým roztokem. Otevření druhého ventilu do odpadu za účelem čištění odstraní ze systému zbytek prvního roztoku.

Vhodněji jsou aminokyseliny preaktivovány a nerozpustné vedlejší produkty z aktivačního kroku
45 jsou filtrovány z roztoku aminokyseliny dříve, než je aminokyselinový roztok zaváděn do systému.

Ilustrativní vybavení systému podle předkládaného vynálezu je schématicky ukázáno na obráz-
50 ku 1 (celkové schéma zařízení) a 2 (detail reaktoru). Systém 1 zahrnuje přípravnou nádrž 3 zajišťující společně s míchadlem rozpouštění aminokyseliny. Je výhodnější použít mechanické míchadlo, ale mohly být také použity další typy míchadel. Rozpouštědla a činidla použitá během syntetických operací mohou být plněna postupně do přípravné nádrže, míchána a optimálně upravena na požadovanou pracovní teplotu s pomocí buď vnitřních spirál (ukázáno) nebo
55 vnějšího vyhřívacího a chladičového pláště. Výhodněji je také přípravná nádrž 3 použita pro

preaktivaci aminokyseliny. Pumpa P1 umístěná v potrubí 4 přenáší reaktanty z přípravné nádrže 3 do třífcestného ventilu V1, kterým je polymer, roztok aminokyseliny nebo rozpouštědel dopraven do přechovávací nádrže 5 potrubím 6 nebo do reaktoru 7 potrubím 8. Jestliže jsou preaktivované aminokyseliny přenášeny do přechovávací nádrže 5, tak jsou tyto aminokyseliny propouštěny přes filtr F1, který dostatečně jemně odstraňuje nerozpustné vedlejší produkty, takové jako je DCU, z roztoků preaktivované aminokyseliny. Filtrované preaktivované aminokyseliny jsou poté přenášeny do přechovávací nádrže 5 potrubím 9. Jak je zmíněno výše, DCU je vedlejším produktem aktivace následující aminokyseliny přidávané k řetězci a může ucpat kuličky polymeru právě tak jako systémové vybavení, takové, jakým jsou rozstříkovací trysky a pumpy. Propouštění roztoku preaktivované aminokyseliny přes filtr F1 za účelem odstranění DCU, které předchází zavedení roztoku aminokyseliny do reaktoru 7, je tudíž upřednostňováno.

Potrubí 11 vede od výstupu z přechovávací nádrže 5 ke vstupu do reaktoru 7. Vhodněji je potrubí 11 opatřeno filtrem F2, měřicí pumpou P2 a tepelným výměníkem H1. Obě strany pumpy P2 jsou opatřeny dvěma ventily V2 a V3, které umožňují činidlům být poslána do odpadu nebo na obnovu. Výhodněji je ventil V2 umístěn proti proudu filtru F2.

Na závěr, výstup z reaktoru 7 je spojen se vstupem do přechovávání nádrže potrubím 13. Čtvrtý ventil V4 je umístěn v potrubí 13, aby posílal činidla z reaktoru 7 do odpadu nebo na obnovu.

Jak může být shledáno, přechovávací nádrž 5 a reaktor 7 jsou částí smyčky vymezené nebo dokončené potrubími 11 a 13. Přechovávací nádrž 5 tedy může být použita k tomu, přijmout vyprázdňený obsah reaktoru 7 a udržovat zásobu omývacích rozpouštědel nebo roztoků aminokyselin pro recyklování zpět přes reaktor. Jak bude diskutováno níže, toto umožňuje reaktoru být skutečně bez povrchových kapalin.

Reaktor 5 je ukázán ve větším detailu na obrázku 2. Skládá se z pláště 15, ve kterém je rotující koš 17 namontován k otáčení. Plášť 15 je vhodněji oddělen od okolní atmosféry, aby se předešlo vypařování reaktantů a omývacích roztoků. Prostor 18 je určen mezi košem 17 a pláštěm 15. Koš 17 je namontován na hřídeli 19. Hřídel 19 je funkčně spojena s motorem M takového přijatelného výkonu, který je schopen roztočit koš 17 tak, aby bylo vyvinuto zrychlení o velikosti nejméně 10 jednotek gravitačního zrychlení (g) na povrchu koše. Vhodnější je zrychlení větší než 15 g a ještě vhodnější je, když je zrychlení na povrchu koše 50 g nebo více. Aby bylo dosaženo zrychlení 50 g na obvodu koše, který má poloměr 15 cm, musí být koš otáčen rychlostí 546 ot./min. Zrychlení, kterého může být dosaženo, je limitováno mechanickými vlastnostmi reaktoru a stlačitelností polymeru.

Koš 17 má pevné dno 21, perforovanou válcovitou stěnu 23 a okraj 22 prodloužený dovnitř od vrcholu stěny 23. Dírkování boční stěny je vhodnější v rozmezí 2 až 5 mm. Filtrační tkanina nebo síťovinová vložka je umístěna na vnitřním povrchu stěny 23 koše a má takový rozměr, aby se zabránilo pronikání polymeru R přes stěnu 23. Síťovinová vložka 25 má vhodněji velikost ok přibližně od jedné desetiny (0,10) do jedné třetiny (0,33) průměru částic polymeru, takže nepropustní kuličky z koše ven, nicméně tekutinu nechá projít skrz. Trubice 24, přivádějící tekutý polymer, je napojena na třífcestný ventil V1 skrz potrubí 8, aby mohl být tekutý polymer zaveden na pevnou fázi. Trubice 24 má na konci vhodněji koleno 26, aby byl tekutý polymer zaváděn na stěnu 23 koše 17. Odstředivé síly vznikající otáčením koše jsou obecně dostatečně silné na vytvoření hladké vrstvy polymeru na stěně koše. Nicméně trubice 24 může zahrnovat mechanické prostředky pro rozvrstvení tekutého polymeru tak, aby byla zajištěna jednotně silná vrstva polymeru na stěně 23. Mechanické rozvrstvovací prostředky mohou například zahrnovat osově nebo vertikálně prodlužovatelnou čepel, která je v koši radiálně pohyblivá tak, aby byla nastavena požadovaná vzdálenost od stěny 23 koše. Trubka 27, která dodává reaktanty a je napojená na potrubí 11, je prodloužena do koše 17 a zahrnuje mnoho rozstříkovacích trysek 29, které rozstříkují roztok aminokyseliny nebo omývacího rozpouštědla rovnoměrně na otáčející se lůžko pevné fáze. Výstupní potrubí 13 dovoluje reaktantům nebo omývacím roztokům, které prošly přes koš 17, rychle opustit reaktor 7 a vrátit se do přechovávání nádrže 5. Takto nebude reaktor 5

obsahovat žádné množství tekutiny, která by kontaktovala nebo zaplavovala koš. Úroveň kapaliny v reaktoru nebude stoupat v plášti 15 ke dnu 21 koše 17. Protože reaktorový obal nebude zatopen, nebude zde kapalina, která by brzdila koš, což by vyžadovalo větší výkon motoru M.

- 5 Vybavení zařízení může být uzpůsobeno na automatické plnění požadovaných množství kapalin do přípravné nádrže 3, kontrolování zásoby kapaliny v přechovávací nádrži a kontrolování průtokové rychlosti kapaliny tekoucí do reaktoru 7. Kromě toho může být přidán nepovinný vsádkový sekvenátor S, aby byla více automatizována celá operace. Vybavení zařízení (takové jako je IR detektor) může také zajišťovat sledování vývoje deblokace a omývání, takže syntéza může být
10 sledována v daném čase. Kromě toho IR detektor může sloužit jako integrální část automatizovaného procesu a testování nezreagovaných volných aminů může být provedeno hned, jakmile IR detektor udá, že reakce ustala.

- Konstrukce používající nekovové nebo vysoce protikorozně pokryté povrchy se mohly ukázat nezbytné pro některé produkty. V takových případech mohou být součásti reaktorového systému
15 1 vyrobeny nebo spojeny s nereaktivními materiály. Takové materiály zahrnují například slitiny s vysokým obsahem niklu, takové jako je Hastelloy dostupný u Haynes Int'l Inc. of Kokomo, Ind., Teflon® pokrytý polytetrafluoroethylenem a dostupný u E.I. du Pont de Nemours nebo 316 stainless ocel.

- 20 Syntéza může být prováděna následujícím způsobem. Polymer a rozpouštědlo polymeru jsou naplněny do přípravné nádrže 3 a je zapnut agitátor. Kuličky použité pro tekutý polymer jsou malé kuličky, výhodněji menší než 100 μm v průměru, které jsou prokříženy z 0,2 % až 1,5 %. Polymer se například může skládat z boc-Pro-RCM (Merrifieldův polymer, který má navíc
25 navázaný boc-Prolin a je dostupný u Sigma Chemical) a rozpouštědlem může být dichlormethan (DCM). Teplota může být upravena na předurčenou teplotu (takovou jako je 30 °C) prostřednictvím teplotního regulátoru TIC v nádrži 3. Zatímco je tekutý polymer míchán, koš 17 začíná být roztáčen a upravován na požadovanou rotační rychlost (takovou jako je 1000 otáček za minutu), aby se vyvinulo zrychlení nejméně 10 g, vhodnější je větší než 15 g a nejvhodnější je
30 50 g nebo větší. Tekutý polymer je plněn přímo do reaktoru prostřednictvím potrubí 8 a trubky 24. V koši 17 není žádná kapalina v okamžiku, kdy je tekutý polymer zaváděn do koše. Odstředivé síly působící na polymer způsobí, že polymer vytvoří relativně rovnoměrný koláč R (obr. 2) na vnitřním povrchu koše. Vrstva R je vhodněji vybudována s počáteční tloušťkou mezi 2 až 6 cm. Jiné tloušťky by samozřejmě mohly být použity také. Další rozpouštědlo polymeru nebo
35 recyklovaný filtrát může být zaveden do přípravné nádrže 3, aby byl spláchnut zbylý polymer do reaktoru 7. Měřicí pumpa P2 je aktivována, aby bylo recyklováno rozpouštědlo polymeru přes reaktor a byla tak jistota, že se vytvořila jednotná vrstva v reaktoru. Jakmile koláč R dosahuje požadované tloušťky, je zbývající rozpouštědlo polymeru převedeno do odpadu odkloněním třicestného ventilu V3 do odpadu a působením pumpy P2, dokud není přechovávací nádrž 5
40 prázdná.

- Čepel nebo nůž, diskutované výše, mohou ulehčit rozprostření polymeru na boční stěnu, aby bylo jisté, že vzniká koláč rovnoměrné tloušťky. Jak je polymer aplikován na stěnu 23, a jestliže dojde
45 k tomu, že vzniká vrstva větší tloušťky než je požadováno, pak čepel otre přebytečný polymer, jak může být oceněno. Nicméně jak je poznamenáno, takové, mechanické rozvrstvací prostředky nejsou obecně vyžadovány k tomu, aby vznikl hladký polymerní koláč.

- Roztok, který odblokovává N-konec peptidu vázaného na polymer, je připravován v přípravné nádrži 3. Příklady deblokačních roztoků zahrnují čistou kyselinu trifluoroctovou (TFA) nebo
50 roztoky TFA a DCM (dichlormethan). Deblokační roztok je převáděn do přechovávací nádrže 5 potrubím 6. Pumpa P2 je aktivována a deblokační roztok je prováděn přes reaktorovou smyčku. Roztok je pumpován do reaktoru z přechovávací nádrže 5 přes potrubí 11 a trubku 27. Deblokační roztok je zaváděn na lůžko s pomocí trysek 29 a přechází přes lůžko do prostoru 18, který je mezi košem 17 a pláštěm 15. Roztok opouští reaktor 7 a vrací se do přechovávací nádrže
55 5 přes potrubí 13. Jakékoliv zbytky rozpouštědla v potrubích a v polymerním lůžku mohou být

odstraněny odkloněním počátečního množství odstředěného roztoku opouštějícího reaktor 7 do odpadu nebo na obnovu přes ventil V4 v potrubí 13. To ochrání rozpouštědlo polymeru od smíchání s deblokačním roztokem v přechovávací nádrži 5. Následuje odstranění rozpouštědla z polymeru. Zbývající odstředěný roztok opouštějící reaktor 7 je odkloněn od přechovávací nádrže 5 pro recyklování v reaktoru 7. Recyklování pokračuje po předem stanovenou dobu (nejvhodněji okolo 3 minut). Následuje deblokace, kdy je roztok odkloněn do odpadu nebo na obnovu přes ventil V3, jak je popsáno výše vzhledem k rozpouštědlu polymeru.

Jestliže to je požadováno, může být proveden druhý deblokační krok, aby byla jistota, že došlo ke kompletní deblokaci N–konce peptidu vázaného na polymer.

Polymer může být vymyt (například DCM), aby se odstranil deblokační roztok. Vymytí je provedeno naplněním požadovaného množství roztoku do přípravné nádrže, poté převedením roztoku do přechovávací nádrže 5 pumpou P1 a aktivací pumpy P2. Vymývací roztok je převáděn přes reaktor 7 a přechovávací nádrž 5 po určenou dobu, to je po dobu 3 minut. Tak jako předtím je ventil V4 počátečně nastaven na odpad, aby se odstranil zbylý deblokační roztok ze systému. Ventil V4 je poté nastaven na průtok cyklem a vymývací roztok protéká přes systém. Potom co je vymývání hotové, je vymývací roztok odstraněn ze systému přes ventil V3.

Dodatečný vymývací roztok (například s izopropanolem) může být zaveden do zmenšeného polymeru.

Peptid je poté deprotonován vymýváním polymeru zásaditým roztokem, takovým jak je diizopropylethylamin (DIEA), po dobu 20 minut.

Dodatečný omývací roztok DCM může být zaveden, aby došlo k odstranění zásaditého DIEA.

Polymer může být zmenšen vymýváním methanolem (MeOH) nebo dimethylformamidem (DMF).

Polymer může být zvětšen vymýváním DCM.

Následující aminokyselina (například boc–arginin), která má být připojena k peptidovému řetězci je naplněna do přípravné nádrže 3. Aminokyselina je vhodněji preaktivovaná a přípravná nádrž 3 je také naplněna vhodným rozpouštědlem nebo rozpouštědly, takovými jako jsou DCM a DMF. Nádrž 3 je naplněna rozpouštědly ve stejné době jako aminokyselinou. Vazebné činidlo, takové jakým je DCC nebo DIC je pak přidáno k roztoku aminokyseliny v přípravné nádrži 3. Následuje období preaktivace, kdy vzniká většina nerozpustných vedlejších produktů. Ventil V1 pracuje, aby zavedl aktivovanou aminokyselinu do přechovávací nádrže 5 přes filtr F1, na němž dochází k odstranění nerozpustných vedlejších produktů aktivačního procesu. Filtr F1 má takovou velikost pórů, která umožní odstranit skutečně všechny nerozpustné vedlejší produkty aktivační reakce. Zfiltrovaný roztok aminokyseliny je pak recirkulován přes reaktor, jak je popsáno výše, dokud není vazebná reakce hotová.

Protože ani plášť ani koš nejsou zaplaveny během reakce, je potřeba méně tekutiny, než by bylo potřeba u míchaného nádržového reaktoru, třepaného baňkového reaktoru nebo dokonce u reaktoru se zaplaveným rotovaným košem. Tato schopnost použít méně kapaliny dovoluje použití vyšších koncentrací aminokyselin bez užití většího množství aminokyselin a tím tedy bez zvyšujících se nákladů na operaci. Takto může být koncentrace aminokyseliny zvýšena například na 300 mmol/l roztoku bez zvýšení množství použité surové aminokyseliny. Jak je známo, reakční rychlost je funkcí koncentrace reaktantu. Tedy schopnost použít méně tekutiny zvyšuje reakční rychlost vazebného kroku. Teplota aktivované aminokyseliny může být kontrolována a přizpůsobena v přípravné nádrži 3 a při recirkulaci v tepelném výměníku H1. Zakončení vazebné reakce může být potvrzeno testovacími vzorky polymeru odebranými z reaktoru.

Polymer může být omyt rozpouštědlem, takovým jako je DMF.

Ner rozpustné vedlejší produkty mohou být odstraněny z polymeru vymytím methanolem (MeOH).

Methanol může být odstraněn z polymeru vymytím rozpouštědlem, takovým jako je DCM.

Proces se opakuje pro další aminokyselinu, která je v sekvenci na řadě. Je potěšitelné, že filtrační tkanina a perforovaná boční stěna koše nahrazují filtrační fritu, která je používána buď v míchaných nádržových, nebo v trubkových SPPS reaktorových systémech. Odstranění geometrických nátlaků malé a oddělené filtrační frity z vyprazdňovací cesty osvobozuje reaktorový systém od tlakových nátlaků uvalených na něj fritou (to znamená, že se konstruktér nemusí starat o poškození frity). Maximální tlak, kterým může být systém vystaven, je tak spojen s velikostí polymerních kuliček a tloušťkou polymerního koláče (tlak nemůže být tak velký, pokud jde o zničení nebo velké stlačení polymerních kuliček) a silou koše 17.

Mezi každým krokem (to znamená zatímco je přechovávací nádrž naplňována následujícím roztokem) je koš 17 udržován v otáčkách. To zajišťuje, že většina předchozího roztoku bude rychle odstraněna z koláče R odstředivými silami před tím, než je následující roztok zaveden do reaktoru 7. Dále, jak je poznamenáno, je ventil V4 otevřen do odpadu na krátký čas na začátku každého cyklu. Toto bude dále zbavovat systém zbytků předchozího roztoku, který možná nebyl odstraněn z koláče R pokračujícím otáčením koše, a který byl odstraněn nynějším roztokem. To zajistí, že ne více než minimální množství předchozího roztoku zbude v systému a usnadní kontrolu expozice peptidového řetězce reaktanty nebo omývacími roztoky.

Jak bylo poznamenáno, koš a polymerní lůžko nejsou zaplaveny. Tedy všechny reaktanty a kapaliny, které jsou zavedeny do koše prochází přes vrstvu R dostatečnou rychlostí. To znamená, že průchod roztoku přes koláč R nebude zdržován tekutinou v prostoru 18 mezi košem a pláštěm reaktoru. Tudíž doba kontaktu peptidu s reaktantem nebo omývacím roztokem může být pozorně a přesně kontrolována pomocí nepřetržitě otáčeného koše a měření délky činnosti pumpy P2.

Relativní rychlost tekuté částice je tak konstrukčně proměnlivá, že může mít vliv na výkon systému, výtěžek produktu a jeho kvalitu. Když je reaktant nebo omývací roztok zaváděn do koše 17, kapalina prochází přes polymer a filtrační tkaninu, jak bylo zmíněno výše, do pláště 15, aby byla recirkulována zpět do přechovávací nádrže. Pokud rychlost, při které kapalina reaktor opouští je v podstatě rovna nebo převyšuje rychlost, kterou je kapalina do reaktoru zaváděna, pak reaktor nebude zaplaven. V závislosti na prostoru mezi dnem reaktorového koše a dnem pláště může být rychlost dodávané kapaliny menší než rychlost kapaliny, která reaktor opouští, pokud je cyklus ukončen před tím, než kapalina dosáhne úrovně dna koše.

Koš 17 má vnitřní poloměr IR (obr. 2) rovný vzdálenosti od středu koše k vnitřnímu konci okraje 22 a vnější poloměr OR rovný vzdálenosti od středu koše k preferované stěně 23 koše. U použitého koše byl vnější poloměr (OR) okolo 15 cm a okraj měl šířku okolo 7,5 cm. Vnitřní poloměr použitého koše tak byl okolo 7,5 cm. Koše jiných rozměrů mohly také být použity. Jakmile je reaktant nebo omývací roztok zaveden do koše 17, budou kapičky roztoku splývat, aby vytvořily kapalinovou stěnu na vnitřním povrchu polymerní vrstvy působením odstředivých sil. Jak se proud roztoku do koše zvyšuje, tak se bude zvyšovat i tloušťka kapalinové stěny. Když je kapalinová stěna dostatečně silná tak, že vzdálenost vnitřního povrchu této kapaliny od středu koše (R [vnitřní] v Tabulce I dole) je menší než vnitřní poloměr koše (7,5 cm), pak roztok přeteče přes okraj 22 koše. Za těchto podmínek je koš účinně zaplaven. Jak může být vidět z Tabulky I dole, pro rotační rychlost 500 ot./min se koš začíná zaplavovat při vstupní průtokové rychlosti mezi 102,8 ml/s a 115,7 ml/s pro tloušťku polymerního koláče 5,5 cm. Pro polymerní koláč tloušťky 2,5 cm se koš začíná zaplavovat, když je průtoková rychlost mezi 217,8 ml/s a 244,9 ml/s. Při rotační rychlosti 1000 ot./min se koš nezaplavuje dokud průtoková rychlost není mnohem vyšší. Pro polymerní koláč tloušťky 5,5 cm se koš nezačne zaplavovat dokud průtoková

rychlost není mezi 449,8 ml/s a 514,1 ml/s a pro polymerní koláč tloušťky 2,5 cm se koš nezačne zaplavovat dokud průtoková rychlost není mezi 952,5 ml/s a 1088,6 ml/s.

- 5 Hodnoty ve spodní Tabulce I byly získány ze série filtračních výpočtů použitím experimentálně získaných hodnot K_p a B , které byly použity pro centrifugu, která měla plochu stěny 63,62 cm². Hodnoty K_p a B byly získány za konstantního tlakového rozdílu P1 37 kPa v prostoru 18 mezi košem a pláštěm. Filtrační parametry takto získané byly použity pro centrifugu, která měla poloměr 15 cm a stěnu koše o ploše 1413 cm², k vypočítání průtokových rychlostí kapalin, aby byl zjištěn pokles tlaku (v tloušťce kapaliny) pro různé rotační rychlosti. Změny tlaku P1
10 a filtrační plochy budou mít vliv na filtrační koeficienty K_p a B .

Tabulka I: Vypočítané hodnoty poklesu tlaku při průtoku přes polymerní koláč

	Area filter cloth	63,62	cm ²		A2/A1	22,21		
	Area Basket	1413	cm ²		P1 (in. Hg)	11		
	K_p	0,00038	s/cm ⁶					
	B	0,0051	s/cm ³		Vol. basket	8884,00		
	Vol. filter	400	ml		Cake ht.	5,5	(cm)	
Pressure (cm. DCM)	P2 (in. Hg)	Flow (ml/s)	Flow (ml/s)	P2/P1	K_p	B	R [inner] cm	
	Bed Depth (cm)	5,50	2,50				1000 RPM	500 RPM
10,17	1	12,85	27,21	0,091	8,4738E-06	2,53E-03	14,84	14,36
20,35	2	25,70	54,43	0,182	4,2369E-06	1,26E-03	14,68	13,69
30,52	3	38,56	81,64	0,273	2,8246E-06	8,41E-04	14,52	12,98
40,69	4	51,41	108,86	0,364	2,1185E-06	6,31E-04	14,36	12,24
50,86	5	64,26	136,07	0,455	1,6948E-06	5,05E-04	14,19	11,45
61,04	6	77,11	163,29	0,545	1,4123E-06	4,21E-04	14,03	10,59
71,21	7	89,97	190,50	0,636	1,2105E-06	3,61E-04	13,86	9,66
81,38	8	102,82	217,72	0,727	1,0592E-06	3,16E-04	13,69	8,64
91,56	9	115,67	244,93	0,818	9,4154E-07	2,81E-04	13,52	7,47
101,73	10	128,52	272,15	0,909	8,4738E-07	2,53E-04	13,34	6,08
111,90	11	141,37	299,36	1,000	7,7035E-07	2,30E-04	13,16	4,27
122,08	12	154,23	326,58	1,091	7,0615E-07	2,10E-04	12,98	
132,25	13	167,08	353,79	1,182	6,5183E-07	1,94E-04	12,80	
142,42	14	179,93	381,01	1,273	6,0527E-07	1,80E-04	12,62	
152,59	15	192,78	408,22	1,364	5,6492E-07	1,68E-04	12,43	
162,77	16	205,64	435,44	1,455	5,2961E-07	1,58E-04	12,24	
172,94	17	218,49	462,65	1,545	4,9846E-07	1,49E-04	12,05	
183,11	18	231,34	489,87	1,636	4,7077E-07	1,40E-04	11,85	
193,29	19	244,19	517,08	1,727	4,4599E-07	1,33E-04	11,65	
203,46	20	257,05	544,30	1,818	4,2369E-07	1,26E-04	11,44	
213,63	21	269,90	571,51	1,909	4,0352E-07	1,20E-04	11,24	
223,80	22	282,75	598,73	2,000	3,8517E-07	1,15E-04	11,02	
233,98	23	295,60	625,94	2,091	3,6843E-07	1,10E-04	10,81	
244,15	24	308,45	653,16	2,182	3,5308E-07	1,05E-04	10,59	
254,32	25	321,31	680,37	2,273	3,3895E-07	1,01E-04	10,37	
264,50	26	334,16	707,58	2,364	3,2592E-07	9,71E-05	10,14	
274,67	27	347,01	734,80	2,455	3,1385E-07	9,36E-05	9,90	
284,84	28	359,86	762,01	2,545	3,0264E-07	9,02E-05	9,66	
295,02	29	372,72	789,23	2,636	2,922E-07	8,71E-05	9,42	
305,19	30	385,57	816,44	2,727	2,8246E-07	8,42E-05	9,16	
356,05	35	449,83	952,52	3,182	2,4211E-07	7,22E-05	7,78	
406,92	40	514,09	1088,59	3,636	2,1185E-07	6,31E-05	6,08	

15

Na obrázku 5 je graf, který ukazuje průtokovou rychlost proti poklesu tlaku v polymerním koláči v koši 17.

20

S potěšením je konstatováno, že maximální průtoková rychlost před počátkem zaplavení je funkcí tloušťky polymerního koláče a poloměru radiální šířky okraje 22 koše. Tedy zvýšením šířky okraje 22 nebo snížením tloušťky polymerního koláče může být zvýšena maximální možná průtoková rychlost. Činnosti reaktoru nebude bráněno žádnou kapalinou na povrchu polymerního koláče (za podmínky, že podstatné množství kapaliny nepřetéká přes okraj 22 cestou okolo koláče). Důležité je, že koš není ponořen (to znamená, že není žádná kapalina vyplňující prostor

18 mezi stěnou koše a pláštěm). Toto povrchová kapalina mohla sloužit ke zvýšení rychlosti průtoku přes polymerní koláč za cenu nepatrně většího objemu kapaliny uvnitř rotujícího koše. Schopnost měnit rotační rychlost podle přání a s neomezeným uspořádáním (protože koš není ponořen v kapalině) dovoluje, aby byly získány vyšší rychlosti kapaliny, než když je ponořený válec rotuje v zatopené nádrži nebo plášti.

Rovnoměrný kontakt kapaliny a pevné fáze je nezbytný pro dobrou činnost reaktoru. Uspokojivý kontakt polymeru s kapalinami může být dosažen s rovnoměrně rozprášenou kapalinou na polymer, který má jednotnou tloušťku koláče a pozorným výběrem průtokové rychlosti kapaliny a rotační rychlosti koše. Průtoková rychlost kapaliny přes koláč pevné fáze je často přímo úměrná poklesu tlaku v kuličce a nepřímo úměrná tloušťce koláče. Nicméně polymer je trochu želatino-
vité. Vysoké odstředivé síly mohou způsobit stlačení polymerního koláče a takto zvýšení odporu k průtoku přes polymerní koláč. Jestliže je koláč stlačen při dostatečně vysokém tlaku, průtok kapaliny přes něj se může snížit s rostoucím poklesem tlaku. Může tedy zde být konečná rotační rychlost, která maximalizuje průtok kapaliny.

Tabulka I nahoře ukazuje rotační rychlosti 500 a 1000 ot./min v koši s poloměrem 15 cm, které odpovídají odstředivým zrychlením $41,123 \text{ cm/s}^2$ (41,9 g) a $164,494 \text{ cm/s}^2$ (167,8 g) na vnitřním povrchu stěny koše. Nicméně může být možné vystavit kuličky polymeru mnohem vyšším zrychlením před tím, než stlačení kuliček odstředivými silami začne bránit průtoku kapaliny přes polymerní koláč. Stlačení kuliček polymeru je funkcí tuhosti kuličky, která je následně vztažena ke stupni zesílení polymeru.

25 Přehled obrázků na výkresech

Na obrázku 1 je náčrt vybavení systému používaného v předkládaném vynálezu;

Na obrázku 2 je zvětšený náčrt reaktoru používaného v předkládaném vynálezu;

Na obrázku 3 je graf ukazující koncentraci boc-aminokyseliny jako funkci vzdálenosti od středu částice (udávána „zetou“) v čtyřech bodech v čase pro případ možného přenosu hmoty přes vrstvu kapaliny;

Obrázek 4 se skládá ze dvou grafů ukazujících koncentraci boc-aminokyseliny jako funkci vzdálenosti od středu polymerní kuličky v čtyřech bodech v čase pro vysoký a nízký odpor vrstvy k přenosu hmoty;

Na obrázku 5 je graf zobrazující vypočítaný průtok přes polymer proti poklesu tlaku v polymerním koláči.

Příklady provedení vynálezu

Centrifuga IEC vybavená motorem s proměnlivou rychlostí a košem z nerez oceli a peristaltická pumpa Cole-Palmer Masterflex Model 7518-12 fungovaly jako reaktor. Koš měl vnitřní průměr 13 cm a výšku 5 cm. Kapalina byla do centrifugy dodávána prostřednictvím hadice Masterflex Phar-Med, typ 6485-24, která posílala proud kapaliny na vrchol středu koše, kde byl proud rozbíjen na řadu kapiček. Tato konstrukce nedovolila úplné nebo plné pokrytí povrchu polymeru jednotným rozstříkem. Přibližný průtok kapaliny byl 200 ml/min. Aminokyseliny a HOBt byly preaktivovány pomocí DCC. Nerozpustná DCU byla odstraněna z roztoku aktivované aminokyseliny vakuovou filtrací před přidáním do reaktoru. Alkoholové (methanol) omývací roztoky nebyly potřeba, protože preaktivací krok odstranil velkou většinu DCU. Způsob byl jinak stejný jako ten, který je popsán v tabulce II dole. Reakce koše byla přibližně 500 ot./min, což odpovídalo zrychlení okolo 18,2 g. Pokles tlaku (při zaplaveném stavu) v 1 cm kapaliny se

specifickou tíží 1,0 za výše popsaných podmínek byl 1645 N/m² (0,24 psi). Filtrační plocha centrifugy pro reaktor je 204 cm² a minimální povrchová rychlost kapaliny v prázdném koši (při průtokové rychlosti 200 ml/min) je 0,98 cm/min. Skutečná průtoková rychlost přes kuličky polymeru je nepřímo úměrná poréznosti vrstvy a měla by být deseti až stonásobkem této odhadnuté průtokové rychlosti.

Byly provedeny experimenty při dvou nastavením. První nastavení bylo prováděno tak, aby bylo určeno chování polymeru když neprobíhají chemické reakce. Polymer byl dispergován v DCM nebo DMF a naplněn do centrifugy, která byla vyplněna polypropylenovou filtrační tkaninou o velikosti 1 až 3 mikrony. Polymer vytvořil na tkanině jednotný koláč, které se zvětšovalo a zmenšovalo, podle toho jak bylo vystavováno účinkům DCM, DMF a MeOH. Vrstva neodpádala během krátkých okamžiků po zastavení centrifugy. Nicméně vrstva neměla tendenci odpadnout, ani když byla nechána uschnout přes noc. Ačkoliv vrstva když uschla praskla, praskliny byly docela úzké. Prázdná místa příležitostně vznikala, ale rychle mizela použitím následujícího omývacího rozpouštědla. Jak bylo řešeno, zavedení kapaliny na povrch kuliček polymeru povrch uhladí. Tyto nepatrné zlomy a prázdné formace tedy nemají vliv na průtok kapaliny přes vrstvu a průtok kapaliny přes vrstvu byl považován za homogenní. Polymer byl také nalezen v efluentu na počátku omývání, ale efluent byl rychle vyčištěn recyklováním. Recyklace kapaliny fungovala neobvykle dobře, protože nenastala žádná akumulace rozpouštědla uvnitř centrifugy, a to umožnilo, aby byl prováděn rychlejší průtokový kontakt, pokud to je požadováno. Ztráty části pevné fáze z centrifugy na počátku vsádkového a omývacího kroku jsou normální a byly při tomto pokusu očekávány, protože nebyly použity žádné záchytné kroužky, aby držely tkaninu na stěně koše. Výsledky prvního pokusu byly vysoce příznivé a posílily mechanickou proveditelnost reaktorového systému.

V rámci druhého experimentu byl syntetizován dipeptid boc-Arg-Gly na methylbenzhydrylaminovém (MBHA) polymeru, aby byla ukázána vhodnost reakčního zařízení pro syntézu malých peptidů. Nakonec byly reakčně navázány poslední tři aminokyseliny peptidu Leuprolidu, za účelem dotvořit Leuprolid (pGlu-His-Trp), aby byla demonstrována vhodnost reakčního zařízení pro syntézu středně dlouhých peptidů. Použitý způsob je popsán dole v tabulce II.

Tabulka II: Způsob syntézy na pevné fázi

Krok	Operace	Přibližný čas
1	1 x promytí DCM (pouze první aminokyselina)	3 min
2	1 x 50 % TFA/DCM promytí obsahující 0,5 % DTE a 1 % -metylindolu po zavedení Cys	3 min*
3	1 x 50 % TFA/DCM promytí obsahující 0,5 % DTE a 1 % -metylindolu po zavedení Cys	20 min
4	2 x promytí DCM	3 min*
5	2 x DIEA/DCM neutralizace	4 min každá*
6	1 x DCM promytí	3 min*
7	2 x MeOH promytí (pouze pro první aminokyselinu)	3 min každé
8	2 x DMF promytí	3 min každé*
9	Reakce s preaktivovanou boc-aminokyselinou	Min. 30 min
10	Ninhidrinový test	
11	Ninhidrinový test (je-li třeba)	
12	2 x DMF promytí	3 min každé*
13	2x DCM promytí	3 min každé*

5 * Čas promývání pro Leuprolid zvýšený na 5 minut

V první syntéze (to znamená boc-Arg-Gly) bylo 20 g MBHA polymeru s inkorporačním poměrem 1 meq proteinu/g polymeru použito jako výchozí materiál. 60 mmol (3 eq) boc-Gly, HOBT a DCC bylo použito pro první vazebnou reakci. Aminokyselina byla preaktivována po dobu 15 minut a DCU odstraněna filtrací. Po první hodině reakční doby byla centrifuga zastavena, byly odebrány vzorky a volné aminové skupiny testovány ninhydrinovým testem. Vzorek prošel ninhydrinovým testem. Vsádka byla deblokována pomocí DCM a TFA a ponechána stát přes noc.

15 Následující vazebná reakce byla prováděna s 60 mmol boc-Arg(TOS) stejným postupem, který byl popsán výše pro boc-Gly. Vzorky odebrané po 1 hodině a 2 hodinách vazebné reakce neuspěly v ninhydrinovém testu. Vsádka byla podrobena nové vazebné reakci s 1,5 eq boc-Arg(TOS), HOBT a DCC preaktivovaným 3 minuty (aby se minimalizoval vznik laktámového cyklu). Ninhydrinový test byl poté úspěšný.

20 Druhá část experimentu zahrnovala připojení posledních tří aminokyselin (Glu-His-Trp) k Leuprolidu. Byl získán pre-Leuprolid (post-Ser). V tomto momentě obsahoval peptid-polymer okolo 0,5 meq peptidu/g polymeru. Použitý způsob byl stejný se způsobem popsáním v tabulce II výše, kromě toho, že byla přidána recirkulační nádoba, která byla tvořena baňkou s kulatým dnem a uzavřenou povrchovou skleněnou hlavou s ponořenou hadicí. Otvor na vrcholu centrifugy byl uzavřen plastikovou kádinkou s vříznutým otvorem pro napouštěcí hadici. Tyto změny byly udělány, aby se redukovaly ztráty rozpouštědla vypařováním.

První vazebná reakce v novém uspořádání byla s boc-TRP. Vzorek odebraný po první hodině uspěl v ninhydrinovém testu. Druhá vazebná reakce byla s boc-His(BOM). Rychlost pumpy byla zvýšena a reakce ve vsádce probíhala další hodinu. Po uplynutí reakční doby byly odebrány tři vzorky polymeru, každý z vrcholu, středu a dna vrstvy a individuálně testovány na volné amino skupiny. Ninhydrinový test byl velmi silně pozitivní pro každý vzorek. Vsádka byla podrobena nové vazebné reakci s 1,5 eq boc-His(BOM) a po jedné hodině byla úspěšně podrobena ninhydrinovému testu. Poslední vazebnou reakcí byla reakce s p-Glu. Vsádka byla podrobena vazebné reakci po dobu jedné hodiny a vzorek uspěl v ninhydrinovém testu. Konečná hmotnost peptid-polymeru byla 32 gramů, 2,0 gramy peptid polymeru byly štěpeny s ethylaminem, což vykazovalo 802 mg chráněného peptidu. Surový peptid byl testován na HPLC s reverzní fází a vykázal typický pás pro surový Leuprolid.

Výsledky první řady experimentů naznačují, že polymer vytváří jednotné lůžko na stěně centrifugy a má malou tendenci zhroutit se nebo se provalit. Kromě toho polymerní lůžko vykazuje minimální trhliny. Prázdná místa a trhliny se ztrácejí při promývání a průniky v polymeru jsou obvykle docela malé. Čisté průlomy polymeru do filtrátu během vazebných experimentů téměř neexistovaly, kromě posledního vazebného kroku. Lepší metody utěšňování filtračních prostředků jsou k dispozici a očekává se řešení tohoto problému.

S potěšením je konstatováno, že reaktorový systém nastavený podle toho jak bylo popsáno výše a způsob provozu tohoto systému zabráňuje zaplavování systému rozpouštědly a reaktanty a dovoluje velké průtokové rychlosti přes polymer. Výhod tohoto systému je mnoho a zahrnují:

- Mnohem přesnější kontrolu teploty během aktivace, vazebné reakce a deblokace. To je možné, protože není ponořen v zaplavovaném plášti. Tudíž vše co je potřeba kontrolovat je teplota kapaliny v potrubí 11 a ve vstupní trubce 26.

- Zmenšené množství nezbytného rozpouštědla, protože nebude potřeba naplnit rozpouštědlem plášť 15 ani dispergovat polymer, jako je to v případě STR.

- Zmenšené množství použité aminokyseliny nebo zvýšené reakční rychlosti. Reakční rychlosti jsou úměrné koncentraci reaktantů. Protože objem rozpouštědla může být zmenšený, nároky na množství aminokyseliny jsou také menší, aby byla dosažena stejná koncentrace. Jestliže množství aminokyseliny není zmenšeno, koncentrace budou vyšší a reakční rychlost se úměrně tomu zvýší.

- Vyloučení velmi hořlavých rozpouštědel. Protože aminokyseliny jsou preaktivovány a filtrovány, tak množství DCU v polymeru by mělo být velmi malé. Výsledkem tedy je, že omývací roztoky, jako jsou methanol nebo izopropanol, nejsou nezbytné. Vyloučením alkoholových omývacích roztoků se odstraní „mačkání“ polymeru, které by mohlo poškodit kuličky polymeru. To také samozřejmě zmenší celkový čas potřebný pro vazebnou reakci každé aminokyseliny na peptid. Další výhodou je, že z procesu mohou být vyloučenina nukleofilní rozpouštědla, což odstraňuje nebezpečí vnesení možné smíšené kontaminace nebo nedostatečného odstranění těchto „reaktivních“ látek.

- Vyloučení poničení polymeru způsobeného střížnými ději agitátoru při dispergování kuliček v míchané nádobě. Polymer není zatěžován mícháním jako v případě STR. Je tedy méně stříhového lámání kuliček polymeru od konců čepelí vysoko rychlostního agitátoru.

- Schopnost odvést teplo vznikající při deblokační reakci. Recirkulovaná kapalina může být chlazená ve vnějším tepelném výměníku a polymer proto bude souvisle vystavován chladnému roztoku DCM/TFA.

- Schopnost zlepšit kvalitu a výtěžky peptidu rychlým odstraněním karbokationtů, které vznikají při prvním plnění TFA během deblokační reakce. To může být provedeno, protože

promývací roztoky mohou být chlazeny a recyklovány nebo vyřazeny po jednom projití přes reaktor.

5 – Schopnost zmenšit velikost částic polymeru a ještě udržovat vysokou relativní rychlost toku do částice, která je ve stabilním koláči, s poklesem tlaku, který je ovlivnitelný volně rotujícím neponořeným košem.

10 – Zlepšené rychlosti přenosu reaktantů mezi kapalinou a aktivními místy uvnitř polymeru, protože preaktivace polymeru zahrnuje odstranění DCU filtrací.

10 – Kratší a více kontrolované doby kontaktu kapaliny s neponořeným košem a rychlejší filtrační doby, jejichž výsledkem je kratší doba cyklu a více kontrolovaná doba expozice TFA peptid-polymeru.

15 – Odstranění frit, které se mohou zlomit nebo být blokovány fragmenty polymeru nebo nerozpustnými vedlejšími produkty. Jak bylo popsáno výše, fritu byla nahrazena perforovanou stěnou 23 koše 17.

20 – Mnohem lépe fungující omývání, protože polymer může být točen relativně suchý mezi jednotlivými promýváními a první část následujícího roztoku může být vyřazena spíše než recyklována. To má vliv na rychlé očištění polymeru od předešlého roztoku.

25 – Přizpůsobení zmenšování a zvětšování polymerního koláče jednotné vrstvě koše. Na rozdíl od trubkových reaktorů je poměr objemu polymerního koláče k filtrační ploše (to znamená stěně koše) malý.

30 Tento popis je uveden pouze pro ilustrativní účely a není úmyslně omezen. Změny v rámci připojených nároků mohou být jasné těm, kteří se daným stavem techniky zabývají. Například DIC může být nahrazen DCC jako aktivačním činidlem. Použitím DIC nevznikají nerozpustné vedlejší produkty (takové jako DCU), které by zahltily polymer. Použití DIC jako aktivačního činidla tedy odstraňuje potřebu methanolových omývacích prostředků a preaktivaci, což sníží celkovou dobu nezbytnou pro syntézu peptidu. Přípravná nádrž 3 může být odstraněna ze systému a všechny roztoky mohou být připravovány v přechovávácí nádrži 5. To by vyžadovalo, aby kontrolní zařízení spojená s přípravnou nádrží byly spojeny s přechovávácí nádrží, a aby filtr F1 byl umístěn v potrubí 11 nebo ve filtrační smyčce na potrubí 11. Ačkoliv koš rotuje horizontálně na vertikální ose, mohl by být rotován na horizontální ose, tak že koš je na této straně, nebo by mohl být rotován dokonce na skloněné ose (to znamená pod úhlem méně než 90° od vertikální osy). Tyto příklady jsou pouze ilustrační.

40

Průmyslová využitelnost

45 Způsob syntézy peptidů na pevné fázi a příslušné zařízení k provádění této syntézy jsou použitelné v poloprovozním a provozním měřítku.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi v reaktorovém systému (1), **vyznačující se tím**, že uvedený reaktorový systém (1) obsahuje pro syntézu reaktor (7), který má plášť (15), koš (17) umístěný v plášti (15) a opatřený porézní stěnou (23) a rotující kolem osy požadovanou rotační rychlostí, s menším průměrem než plášť (15), přičemž koš (17) a plášť (15) vymezují
10 prostor (18) mezi vnějším povrchem koše (17) a vnitřním povrchem pláště (15) a kde způsob zahrnuje následující kroky: (a) suspenze polymeru se dodá do rotujícího reaktorového koše (17), aby došlo k vytvoření koláče (R) jednotné tloušťky na stěně (23) koše (17), (b) deblokační roztok se dodá do rotujícího koše (17), aby došlo k odblokování N-konce peptidu vázaného na polymer; (c) jeden nebo více vymývacích roztoků se v kroku očištění dodá do rotujícího koše (17), aby
15 došlo k vymytí deblokačního roztoku z koláče; (c) roztok následující aminokyseliny, která má být připojena k peptidovému řetězci, a vazebné činidlo se dodá do rotujícího koše (17), pro připojení následující aminokyseliny k peptidovému řetězci; kroky (c) až (d) se opakují, dokud není peptidový řetězec kompletní; deblokační roztok, vymývací roztok, roztok aminokyseliny a roztok vazebného činidla se zavádějí do rotujícího koše takovou rychlostí, aby se dodávané roztoky
20 nehromadily v plášti (15) reaktoru (7) a zaplavovaly koš (17), přičemž koš (17) je v nezaplaveném stavu během každého kroku syntézy peptidu.

2. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že první aminokyselina požadované sekvence peptidu se naváže na aktivní místo polymeru, aby
25 vznikla vazba peptid-polymer.

3. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že polymer je tvořen styrenovými kuličkami.

30 4. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že tyto kuličky mají průměr menší než 100 μm a jejich materiál je zesíťován z 0,2 % až 1,5 %.

5. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že koš (17) rotuje rychlostí k vytvoření odstředivých sil, které udrží vrstvu polymeru proti stěně koše.
35

6. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že koš (17) rotuje rychlostí dostatečnou pro získání odstředivé síly na vnitřním povrchu koše (17), nejméně 100 ms^{-2} (10 g).
40

7. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedený reaktorový systém (1) obsahuje přechovávací nádrž (5), reaktor (7) mající výstup z pláště (15) pro dopravu kapaliny prvním potrubím (13) ke vstupu do přechovávací nádrže (5), přechovávací nádrž (5) mající výstup pro dopravu kapaliny druhým potrubím (11) ke vstupu (27) do reaktoru (7); přechovávací nádrž (5), reaktor (7) a první a druhé potrubí vymezují okruh;
45 přičemž kroky dodávají roztoky do reaktoru (7) obsahují krok dodávky roztoku do přechovávací nádrže (5) a pak transportu roztoku do reaktoru (7); roztok je tlačěn přes koláč a do reaktorového prostoru (18), roztok se vrací do přechovávací nádrže (5) prvním potrubím (13).

8. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že
50 dodávka roztoku do rotujícího koše (17) obsahuje cirkulaci roztoku okruhem po určenou dobu.

9. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že reaktorový systém (1) se očistí od předcházejícího roztoku před zavedením dalšího roztoku do reaktoru (7).
55

10. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že přechovávací nádrž (5) se propojí s odpadem, čisticí krok obsahuje transport jakéhokoliv roztoku z reaktoru (7) do přechovávací nádrže (5), propojení přechovávací nádrže (5) s odpadem a odvedení obsahu přechovávací nádrže (5) do odpadu, transportní krok obsahuje rotaci koše (17) s určenou rychlostí poté, co proběhla určená doba cirkulace a před tím, než začalo zavádění druhého roztoku.

11. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že první potrubí (13) se propojí s odpadem, reaktorový systém (1) se očistí od prvního roztoku, dále se propojí první potrubí (13) s odpadem na předem určenou dobu, během kroku dodávání druhého roztoku do reaktoru (7).

12. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se kontrolují teploty roztoků.

13. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že koláč má tloušťku 2 až 6 cm.

14. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že aminokyselina před dodáním do reaktoru je preaktivovaná aminokyselina.

15. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že roztok preaktivované aminokyseliny se filtruje, aby byly z roztoku odstraněny nerozpustné vedlejší produkty před jeho dodáním do reaktoru (7).

16. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že roztok se filtruje během jeho transportu okruhem na filtru umístěném mezi reaktor (7) a přechovávací nádrž (5).

17. Způsob syntézy peptidu na pevné fázi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že roztoky se rozprašují do reaktoru (7) tryskou na vrstvu polymeru.

18. Reaktorový systém pro syntézu peptidu na pevné fázi, **vyznačující se tím**, že obsahuje reaktor (7), který má plášť (15) se vstupem, výstupem a rotujícím košem (17) uvnitř pláště (15), koš (17) má boční porézní stěnu (23), na které je vytvářen koláč polymeru, přechovávací nádrž (5), do které jsou zaváděny roztoky pro syntézu peptidu, a která má vstup a výstup, výstup z reaktoru (7) je propojen se vstupem do přechovávací nádrže (5) prostřednictvím prvního potrubí (13) a výstup z přechovávací nádrže (5) je propojen se vstupem do reaktoru (7) prostřednictvím druhého potrubí (11), přičemž reaktorový systém (1) má schopnost udržovat reaktorový koš (17) v nezaplaveném stavu, takže není roztokem zaplavován.

19. Reaktorový systém podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že obsahuje prostředky pro očištění reaktorového systému (1) od prvního roztoku použitého při syntéze peptidu předtím, než je do systému přidán druhý roztok.

20. Reaktorový systém podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že obsahuje odpad a první ventil (V2) v druhém potrubí (11), první ventil (V2) je selektivně přepínatelný mezi první polohou, při které roztok opouštějící přechovávací nádrž (5) vstupuje do reaktoru (7), a druhou polohou, při které roztok opouštějící přechovávací nádrž (5) přechází do odpadu, prostředky pro očištění obsahují reaktor (7), přechovávací nádrž a ventil, kde reaktorový koš (17) je uzpůsoben pro rotaci po ukončení cyklu, kdy roztok zbylý v koši přechází do přechovávací nádrže (5) a obsah přechovávací nádrže (5) je pak odveden do odpadu přes ventil (V2).

21. Reaktorový systém podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že prostředky pro očištění dále obsahují druhý ventil (V4) v prvním potrubí (13), který je selektivně přepínatelný mezi

první polohou, při které je výstup z reaktoru (7) propojen s přechovávací nádrží (5) a druhou polohou, při které je výstup z reaktoru (7) propojen s odpadem, a systém má při provozu druhý ventil (V4) přepnut do druhé polohy na předem určenou dobu během dodávání druhého roztoku do reaktoru (7).

5

22. Reaktorový systém podle nároku 18, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje přípravnou nádrž (3) propojenou s reaktorem (7) a přechovávací nádrž (5) a ventil (V1) schopný selektivně vést obsah přípravné nádrže buď do přechovávací nádrže (5) nebo do reaktoru (7).

10

23. Reaktorový systém podle nároku 22, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že suspenze polymeru je připravována v přípravné nádrži (3), ventil (V1) je přepnut pro tečení suspenze polymeru do reaktoru (7), a reaktor (7) obsahuje vstupní trubku (24) pro suspenzi polymeru.

15

24. Reaktorový systém podle nároku 23, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že vstupní trubka (24) pro suspenzi polymeru směřuje suspenzi polymeru proti stěně (23) reaktorového koše (17).

25. Reaktorový systém podle nároku 24, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje rozprašovač, který usnadňuje formování polymerního koláče na stěně reaktoru (7), který je jednotné tloušťky a hladký.

20

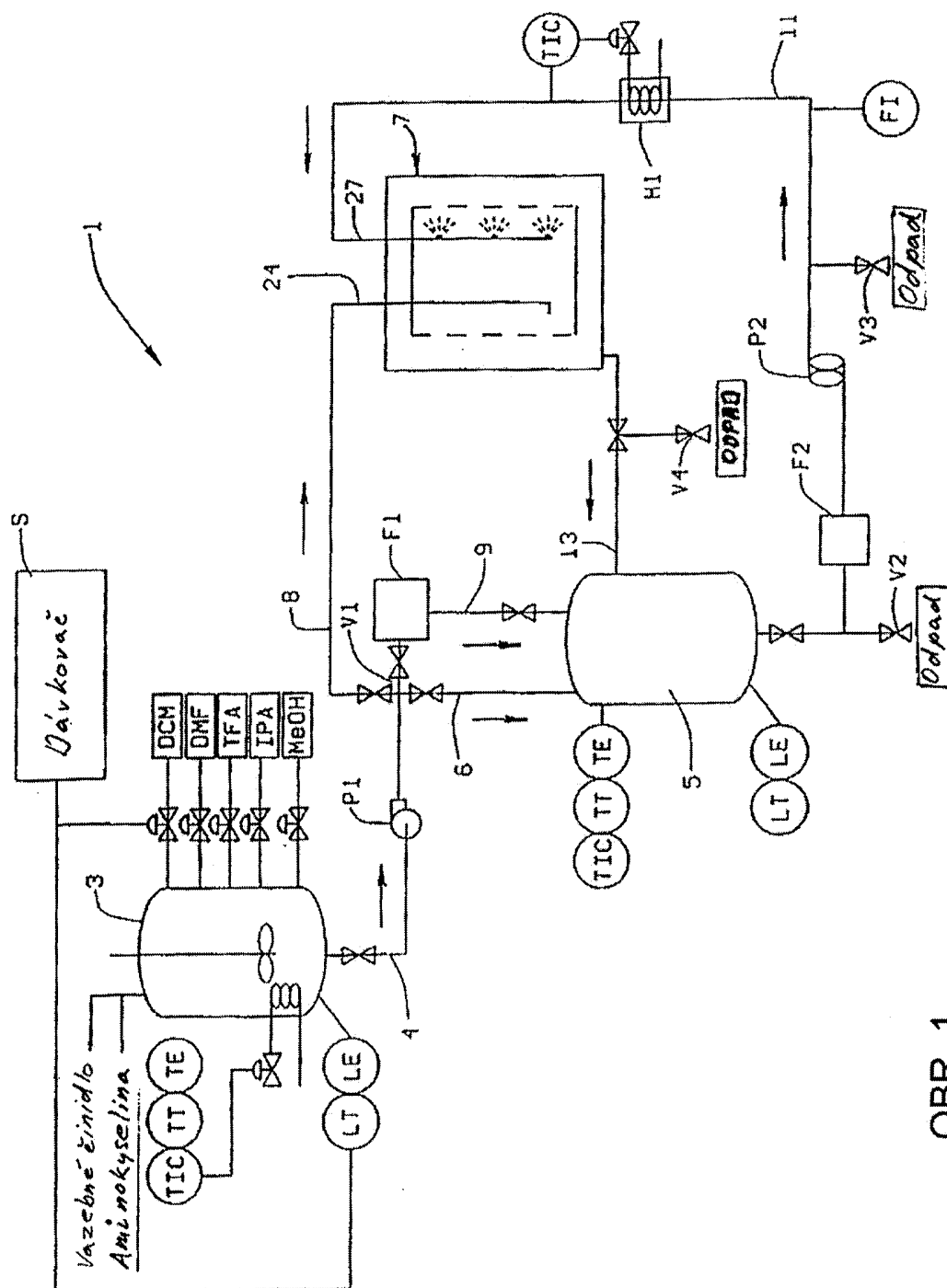
26. Reaktorový systém podle nároku 22, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že roztoky aminokyselin jsou preaktivovány v přípravné nádrži (3), a jsou dopravovány do přechovávací nádrže (5) ventilem (V1).

25

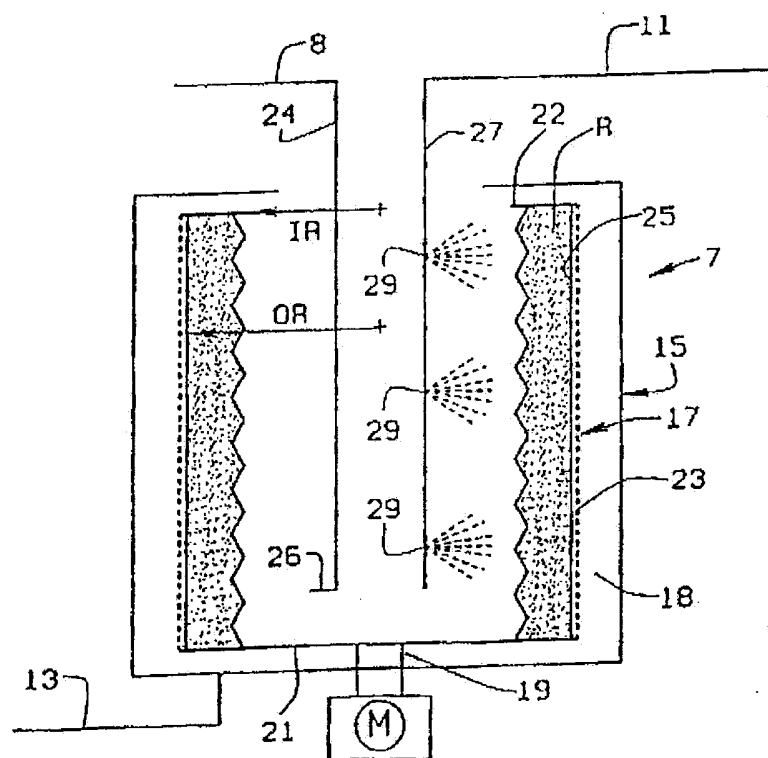
27. Reaktorový systém podle nároku 26, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje filtr (F1) umístěný mezi ventilem (V1) a přechovávací nádrží (5), a roztok aminokyseliny přechází přes tento filtr (F1).

30

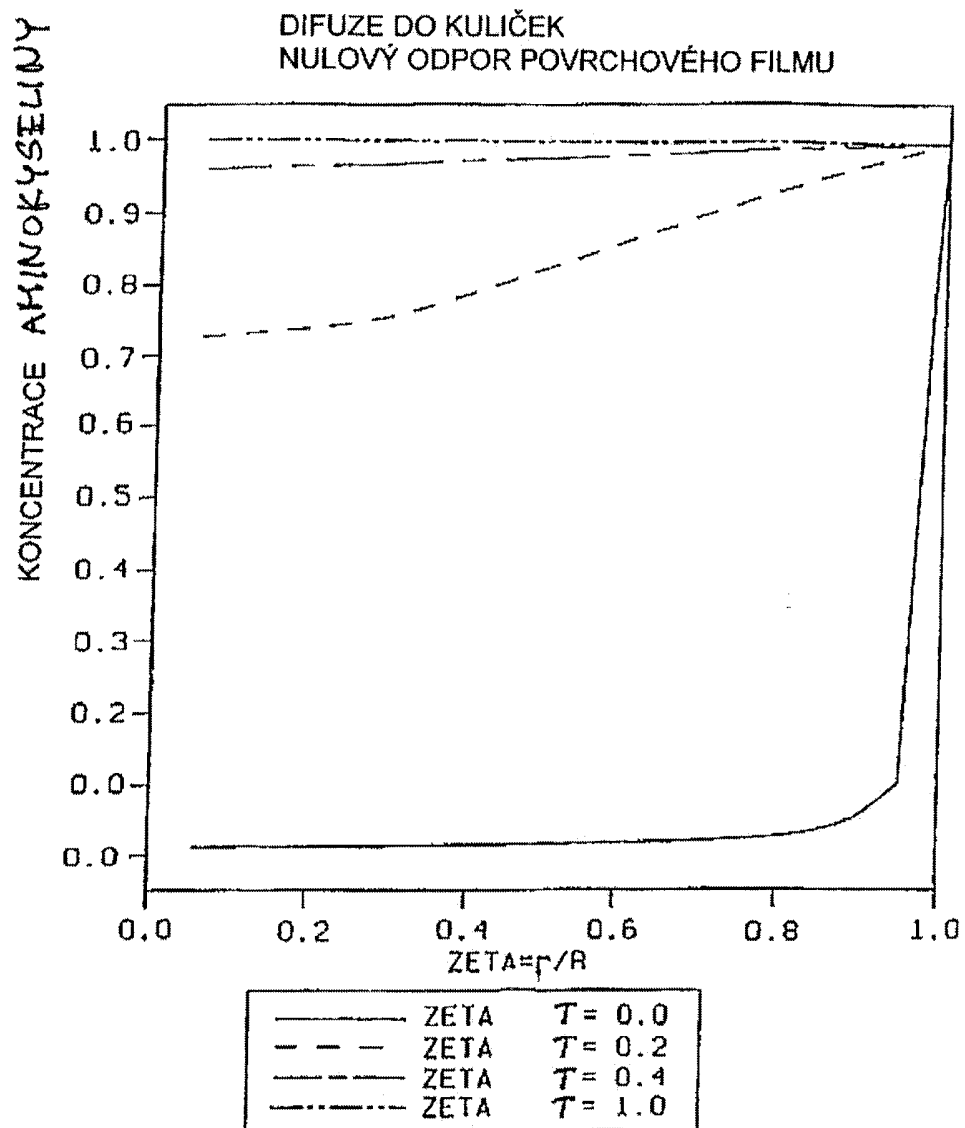
5 výkresů



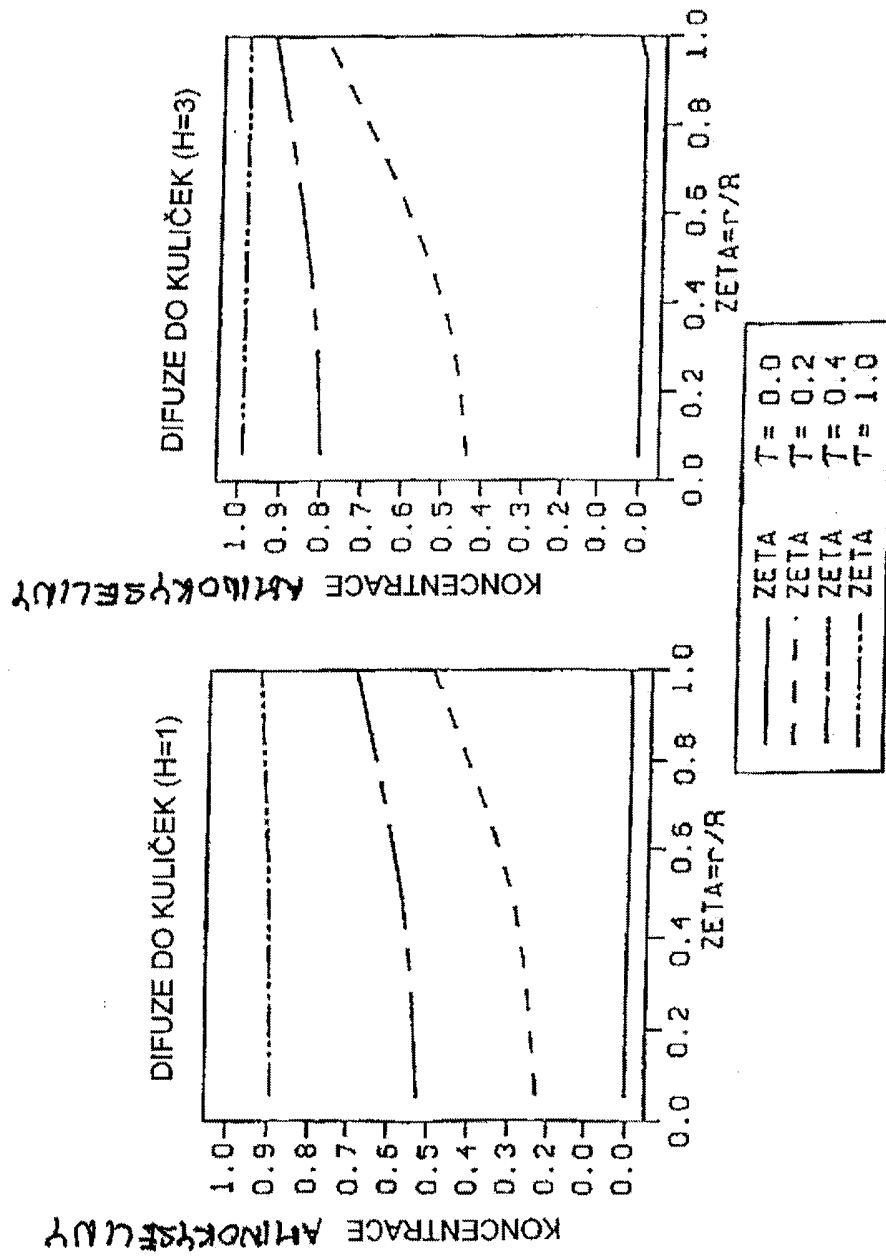
OBR. 1



OBR. 2

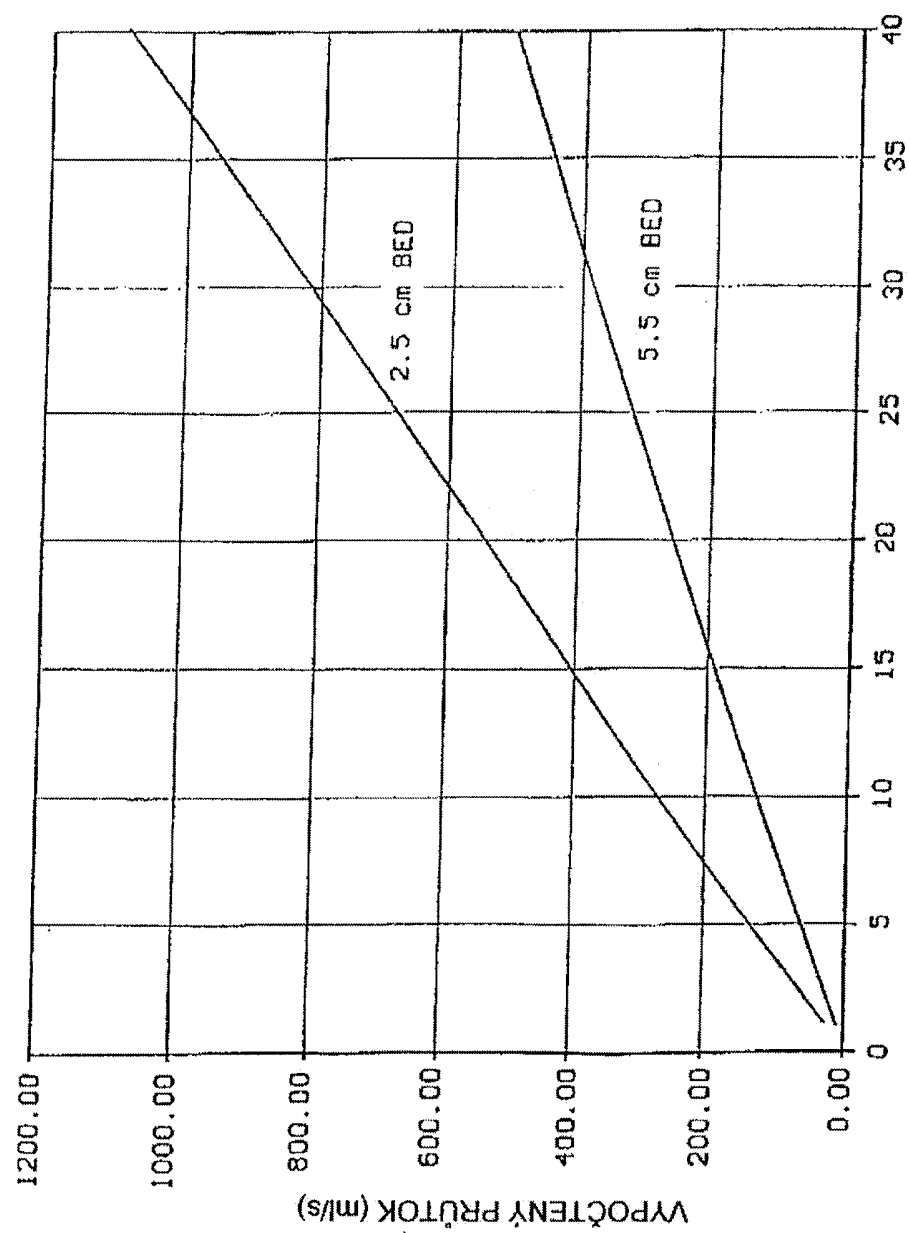


OBR. 3



OBR. 4

PRŮTOK DICHLORMETANU PŘES POLYMER



OBR. 5 POKLES TLAKU NA POLYMER NÍM KOLAČI (V PÁLČÍH Hg)
(1" Hg = 3,34 kPa)

Konec dokumentu