ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

266 630
(11)
(13) B1
(51) Int. Cl.[4]
C 07 K 1/04

(21) PV 3219-88.I
(22) Přihlášeno 12 05 88

(40) Zveřejněno 11 04 89
(45) Vydáno 13 08 90

(75)
Autor vynálezu

JAREŠ VÁCLAV ing., KOLÍNSKÝ JIŘÍ ing.,
KRCHŇÁK VIKTOR RNDr. CSc., KROJIDLO MILAN prom. chem. CSc.,
LEPŠA LUDĚK RNDr., STRNAD FRANTIŠEK, ŠIMEK PETR prom. chem. CSc.,
PRAHA

(54) **Zařízení pro automatickou výrobu peptidů na pevném nosiči**

(57) Zařízení je tvořeno reakčními, odpadními, odměřovacími nádobami, soustavou ventilů a potrubí a podstata řešení spočívá v tom, že zásobníky s kapilárními odměrkami jsou přes automatické ventily a vícecestný ventil spojeny s paralelně zapojenými reaktory, které jsou přes ventily a uzavírací kohouty spojeny s odpadními nádobami. Některé odpadní nádoby jsou přes regenerační odparky a automatický dávkovač spojeny zpět se zásobníky. Reaktory jsou opatřeny přívodem inertního plynu a jsou napojeny na aktivační reaktor, přičemž automatický chod je zajištěn počítačovým ovládačem.

CS 266 630 B1

Vynález se týká zařízení pro automatickou výrobu peptidů na pevném nosiči v provozním měřítku.

Výhody syntézy peptidických látek na pevném polymerním nosiči byly již jednoznačně prokázány, o čemž přesvědčivě svědčí odborná literatura z druhé poloviny sedmdesátých a z osmdesátých let. Nová metoda syntézy peptidů na pevném nosiči umožnila získávat velmi kvalitní syntetické produkty ve vysokých výtěžcích a ve velmi krátkém čase. Odpadly průběžné extrakce, krystalizace, sušení produktů a další časově náročné operace. Fakt, že se čas potřebný k provedení jednotlivých stupňů zkrátil ze dnů na hodiny, ovlivnil významně nejen přípravu peptidických látek v malém laboratorním měřítku pro vědeckovýzkumné účely, ale i provozní výrobu biologicky aktivních peptidů pro farmaceutické zpracování.

Pro přípravu peptidických látek na pevném nosiči byly v zahraničí zkonstruovány různé přístroje, od nejjednodušších až po plně automatizované. Také u nás byly na některých pracovištích dle zahraničních vzorů zkonstruovány a improvizovaně sestrojeny přístroje pro semipreparativní syntézu peptidických látek na pevném nosiči.

Cílem autorů vynálezu bylo zkonstruovat zařízení pro výrobu biologicky aktivních peptidů v provozním měřítku a přitom odstranit hlavní nevýhody dosud známých a komerčně dostupných zařízení, jimiž jsou především

- optoelektromagnetické odměřování jednotlivých reagencií a roztoků, které i při zdvojení (případně ztrojení) čidel není pro výrobní účely zcela spolehlivé a kromě toho nepočítá s případnými výpadky v dodávce elektrického proudu,
- přetlačování roztoků a reagencií do reaktorů skleněnými součástmi přístroje pomocí tlakového dusíku, což nevyhovuje platným bezpečnostním předpisům,
- způsob míchání polymerního nosiče (pryskyřice) mechanickým míchadlem nebo pohybem reaktoru, čímž dochází k narušení struktury pryskyřice a k vytváření jemných částic, které pak znesnadňují promývání a filtraci pevného nosiče v reaktoru,
- nekomplexnost a nevhodnost zařízení pro výrobní a provozní účely a pro práci ve velkých násadách, protože neumožňuje souběžnou přípravu aktivovaných složek chráněných aminokyselin a pokud plně nezreagují, jejich zachycování a regeneraci, neřeší také regeneraci použitých rozpouštědel a oddělené jímání dalších roztoků, určených podle jejich charakteru rovněž k regeneraci anebo k likvidaci.

Uvedené nevýhody odstraňuje zařízení pro automatickou výrobu peptidů na pevném nosiči, skládající se z nádob reakčních, zásobních, odpadních a odměřovacích, soustavy ventilů a potrubí podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že zásobníky s kapilárními odměrkami jsou přes automatické ventily a vícecestný ventil spojeny s paralelně zapojenými reaktory, které jsou přes ventily a uzavírací kohouty spojeny s odpadními nádobami. Některé z odpadních nádob jsou přes regenerační odparky a automatický dávkovač spojeny zpět se zásobníky. Reaktory jsou opatřeny přívodem inertního plynu - míchacího média - a jsou napojeny na aktivační reaktor, přičemž automatický chod zařízení je zajištěn počítačovým ovládačem.

Zařízení podle vynálezu se dále vyznačuje tím, že reaktory mají kulový tvar a jsou opatřeny automatickým oplachovačem stěn mezi plnicími hrdly, umístěnými v horní části reaktorů. Uvnitř reaktorů je u dna frita a v dolní části jsou opatřeny uzavíracím kohoutem, pod kterým je přívod inertního míchacího média.

Zařízení podle vynálezu je dále vyznačeno tím, že kapilární odměrka je tvořena systémem dvou spojených nádob, přičemž do menší kalibrované nádoby je zavedena kapilára, ve které je výška hladiny roztoku shodná s výškou hladiny ve větší nádobě.

Zařízení podle vynálezu zcela eliminuje nebo podstatně omezuje uvedené nevýhody dosud zkonstruovaných přístrojů pro syntézu peptidů na pevném polymerním nosiči. Kromě toho řeší nově i otázku ztrátových časů v činnosti vlastního reaktoru tím, že je vybaveno dvěma, třemi

i více reaktory, zapojenými paralelně, které pracují s výhodou ve střídavém rytmu. V reaktorech o užitečném obsahu 6 až 20 litrů je pak možno zpracovávat násady přes 1 kg pryskyřice. Přitom jsou až na minimum sníženy ztrátové časy, potřebné například k odštěpování chránicích skupin, k neutralizaci reakčních směsí, k mnohonásobnému promývání polymerního nosiče apod., takže výkon zařízení se zvyšuje o 100 % i více, a přiměřeně se podstatně snižuje i pracnost obsluhy aparatury.

Příklad konstrukce zařízení podle vynálezu je znázorněn na připojených výkresech, kde obr. 1 představuje schéma celého zařízení, obr. 2 představuje detail odměřovacího systému a z obr. 3 je patrné provedení vlastního reaktoru. Pro názornost je na obr. 1 silnou čárou znázorněn tok hlavních surovin, slabou čárou tok regenerovaných surovin a přerušovanou čárou přívod míchacího inertního média.

Jak vyplývá z obr. 1, jsou zásobníky na jednotlivé reagencie 1 uloženy na nejvyšším místě aparatury. Zásobníky jsou na dně opatřeny uzavíracími dálkově ovládanými teflonovými ventily 2. Pod zásobníky je umístěn dávkovací (odměřovací) systém, tzv. kapilární odměrka 3. Její funkce je zřejmá z obr. 2. Pracuje na principu spojených nádob za spolupůsobení zemské gravitace, nezávisle na dodávce elektrického proudu, s přesností 2 až 5 promile a odměřovaná množství reagencií lze plynule měnit posouváním kapiláry 19 podle množství zpracovávaného polymerního nosiče. Odměřená reagencie nebo rozpouštědlo stéká samospádem přes ručně ovládaný ventil 4 střídavě do vlastních reaktorů 5. Reaktory 5 mají stěny upraveny silikonováním a na dně jsou opatřeny skleněnou fritou 6, dále uzavíracím kohoutem 7 pro možnost přerušení práce v libovolném okamžiku, přetlakovou přípojkou pro přívod inertního míchacího média, zejména dusíku 8, kterým je obsah reaktorů 5 ze spodu míchán a samočinným oplachovačem stěn 9. Na své dolní části jsou reaktory 5 opatřeny kulovými zábrusy 10, kterými dosedají na kulové plochy dalších teflonových ventilů 11, ovládajících vypouštění reakčních zplodin z reaktorů 5. Za spodním teflonovým ventilem 11 se nalézá odbočka 12, osazená dalším teflonovým ventilem 13, která slouží k odebírání roztoků derivátů nezreagovaných aminokyselin k případné regeneraci. Za odbočkou jsou postupně umístěny jednotlivé odpadní nádoby 14 s rozpouštědly určenými buď k regeneraci na odparce 15 s automatickým dávkovačem 16, nebo ke spálení. Zařízení je dále vybaveno aktivačním reaktorem 17 umístěným v termostatu 18, což umožňuje automatizovanou souběžnou přípravu aktivovaných složek chráněných aminokyselin, které pak lze ve zvoleném okamžiku automaticky převést do příslušného reaktoru 5.

Na obr. 3 je znázorněn reaktor 5, který je skleněný a kulovitého tvaru. Jednotlivé roztoky přicházejí do reaktoru 5 přívodem 21 přes oplachovací zařízení 9 anebo plnicím hrdlem 22, které může být spojeno s pomocným reaktorem 17 pro přípravu aktivovaných aminokyselin. Ve dně reaktoru je vtavená skleněná frita 6, kterou je oddělen polymerní nosič od dalších částí aparatury a která umožňuje odsávání pevné pryskyřice od kapalných reagencií a rozpouštědel v reaktoru 5. Reaktor je v horní části vybaven pojistkou přetlaku míchaného média 23. K míchání reagujících komponent v reaktoru 5 se jako míchací médium používá nejčastěji dusík, jehož přívod 8 je umístěn pod uzavíracím kohoutem 7. Reaktor 5 dosedá kulovým zábrusem 10 na kulovou plochu vypouštěcího teflonového ventilu 11.

V průběhu vyhledávání nejvhodnější konstrukce a rozměrů reaktorů 5 se nejlépe osvědčil kulový reaktor s poměrem největšího průřezu ku ploše spodní frity 6 4:1 (viz obr. 3). Při tomto poměru dochází při míchání dusíkem k dokonalému horizontálnímu promíchání obsahu reaktoru během několika sekund, nevzniká nežádoucí tzv. "pístový efekt" (častý u válcovitých reaktorů), velmi křehký polymerní nosič je mechanicky minimálně namáhán a nedochází k jeho drcení na malé částečky, které by ucpávaly frity reaktorů a znesnadňovaly filtraci.

Autory nálezu bylo zjištěno, že na vícecestný ventil 4 může být napojeno tolik reaktorů, kolikacestný ventil to je. Celé zařízení podle vynálezu je vybaveno regulačními teflonovými ventily 2 tuzemské výroby, ovládanými stlačeným vzduchem. To umožňuje poloautomatické ovládání všech důležitých součástí, zařízení je však možno i plně automatizovat připojením na výstup poměrně jednoduchého programovatelného ovládače 19, nebo je lze za mimořádných

okolností ovládat i ručně, například v případě přerušení dodávky elektrického proudu. To umožňuje dokončit syntézu i ve vyjímečných případech a zabránit tak statisícovým škodám.

Zařízení podle vynálezu pracuje tímto způsobem: Nejprve se naplní všechny zásobníky 1 potřebnými roztoky, hladiny roztoků kapilárních odměrek 3 se nastaví do vypočtené výše, reaktory 5 se naplní odváženým množstvím polymerního nosiče, zapne se proud a otevře se přívod stlačeného vzduchu do ovládače 19, otevře se přívod dusíku 8, určeného k míchání obsahu reaktorů 5 a spustí se chlazení termostatu 18. Pomocí tlačítek ovládače 19 se pneumaticky otvírají teflonové ventily 2 a obsah zásobníků 5 zaplní odměrky 3 na požadované objemy, jejichž velikost je dána úrovní zasunutí odměřovacích kapilár 20. Tato úroveň zůstává obvykle během jedné syntézy konstantní. Odměrná množství roztoků a rozpouštědel stékají v předem stanoveném sledu do reaktorů 5, kde se proudem dusíku polymerní nosič promíchá s odměřeným roztokem. Po provedení každého syntetického "kroku" se na povel z ovládače 19 odsaje pomocí teflonových pneumatických ventilů 11 zreagovaný roztok (podle druhu odpadu) do příslušné odpadní nádoby 14.

Zařízení podle vynálezu bylo prozatím vyzkoušeno k provozní výrobě některých syntetických peptidů, například k výrobě Desmopresinu, Carbetocinu a oxytocinu, a to v násadách 450 až 1 000 g polymerního nosiče. Ze získaných zkušeností je zřejmé, že celé zařízení je možno v případě potřeby dále zvětšovat podle požadované velikosti výroby. Celé zařízení je z bezpečnostních důvodů zakryto bezpečnostními skly a opatřeno výkonným odtahem.

Přínosem zařízení, podle vynálezu pro provozní výrobu peptidů jsou hlavně tyto efekty:

- podstatné zjednodušení obsluhy a snížení fyzické námahy pracovníků,
- zvýšení produktivity práce v porovnání se známými zahraničními přístroji o 100 i více procent,
- zvýšení bezpečnosti práce obsluhy uplatněním nových konstrukčních prvků,
- maximální univerzálnost a komplexnost zařízení pro použití při syntézách peptidů,
- snížení spotřeby surovin a energie.

Další výhodou zařízení podle vynálezu je to, že je řešeno komplexně, takže umožňuje provádět vedle vlastní syntézy peptidického řetězce souběžně i některé s tím související pomocné operace, jako např. automatizovanou přípravu aktivovaných složek aminokyselin, regeneraci rozpouštědel a zachycování i regeneraci nezreagovaných derivátů chráněných aminokyselin. Nová konstrukce reaktorů 5 umožňuje dále dokonalé míchání polymerního nosiče a přitom snižuje na nejnižší míru nebezpečí jeho mechanického poškození. Vlastní reaktory 5 jsou zdvojeny a pracují paralelně, takže odstraněním ztrátových časů se zvyšuje výkon zařízení prakticky na dvojnásobek, přičemž je v závislosti na vícecestném ručním ventilu 4 možné zapojit i více reaktorů 5. Nové jednoduché odměřování roztoků zajišťuje maximální spolehlivost s vysokou přesností 2 až 5 promile.

Zařízení podle vynálezu je doloženo následujícími příklady provedení, aniž by jimi bylo omezeno.

P ř í k l a d 1

Benzylthiopropionyl-tyrosyl fenylalanyl-glutaminil-asparaginyl-S-benzylcysteinyl--prolyl-tosyl-D-arginyl-glycyl-copoly(1%-divinylbenzen-styren)

T a b u l k a 1

Sled kroků v jednom syntetickém cyklu

Tabulka 1 pokračování

Operace	Činidlo	Čas	Počet operací
štěpení Boc	HCl/CH2Cl2	60 min	1
promývání	CH2Cl2	2 min	1
promývání	CH2Cl2 nebo isopropylalkohol	2 min	2
promývání	CH2Cl2	2 min	2
neutralizace	10% TEA v CH2Cl2	2 min	2
promývání	CH2Cl2	2 min	5
kondenzace	akt. komponenta	60 min	1 až 3
promývání	CH2Cl2	2 min	3

Příprava aktivovaného derivátu aminokyseliny při jednotlivých kopulacích:

	1. kopulace			2. kopulace			aktivace ve směsi
	g Boc-AMK	g HOBT	g DCC	g Boc-AMK	g HOBT	g DCC	CH2Cl2-DMF
Boc-D-Arg(Tos)	68,67		32,96				4-1
Boc-Pro	43,06	27,0	41,2				3-1
Boc-Cys(Bzl)	77,8	33,75	51,5	15,56	6,75	10,3	3-1
Bos-Asn	58,07	33,75	51,5	23,23	13,5	20,6	1-1
Boc-Gln	64,03	35,1	53,56				1-1
Boc-Phe	71,63	36,45	55,62				1-1
Boc-Tyr	70,3	33,75	51,5	42,18	20,25	30,9	1-1
	3. kopulace:			11,24	5,4	8,24	
Mpa(Bzl)	49,07	33,75	51,5	19,63	13,5	20,6	1-1

Do reakční nádoby pro syntézu peptidů v pevné fázi se umístí 100 g esterifikované pryskyřice, obsahující cca 1,0 mmol Boc-Gly/g pryskyřice. Přidávkujeme 800 ml CH2Cl2, suspenze se promíchá proudem vzduchu a ponechá v klidu 2 min. CH2Cl2 se odsaje a promývání se opakuje 3x550 ml CH2Cl2. Po odsátí CH2Cl2 pryskyřice nabobtnalá a je připravena pro vlastní syntézu. Syntéza zahrnuje 8 cyklů, každý cyklus sestává z těchto kroků: štěpení chránicích skupin, promývání, neutralizace, promývání, kondenzace a promývání. Sled jednotlivých kroků v jednom cyklu je uveden v tab. 1. Jednotlivé cykly se od sebe liší pouze v jednom kroku, kdy je kondenzována chráněná aminokyselina. Každý krok se skládá z přídavkování 550 ml kapaliny, promíchání proudem vzduchu, ponechání v klidu po dobu uvedenou v tabulce 1 a odsátí kapaliny. Pokud je reakční doba delší než 5 min, je nutno každých cca 5 min reakční suspenzi promíchat proudem vzduchu. Při odštěpování chránicích skupin plynným HCl je nutno zavádět proud HCl do reakční suspenze po celou dobu štěpení, jinak se koncentrace HCl v DCM snižuje a štěpení Boc skupin probíhá neúměrně dlouho. HOBt ester pro kondenzaci se připraví tímto způsobem:

potřebné množství roztoku DCC v CH2Cl2 (zásobní roztok se připraví rozpuštěním 250 g DCC v 500 ml CH2Cl2) se vychladí na 0 °C a přilije se k vychlazenému roztoku (0 °C) Boc-aminokyseliny a HOBt tak, aby vznikl roztok aktivní komponenty právě v 500 ml směsi DCM-DMF. Reakční směs se míchá při 0 °C 60 až 90 minut, přičemž se reakční teplota nechá vystoupit plynule na teplotu místnosti. Vyloučená DCHM se odsaje a roztok takto aktivované Boc-aminokyseliny se použije bezprostředně pro kondenzaci.

Průběh štěpení chránicích skupin a kondenzace se sleduje ninhydrinovým testem. Reakční dobu je nutno prodloužit, je-li test pozitivní. Pokračovat v syntéze lze tehdy, až je test negativní (bezbarvý nebo mírně narůžovělý).

Po ukončené syntéze se peptidyl-pryskyřice promyje 3xCH2Cl2 a 3xMeOH a vysuší se volně na vzduchu. Výtěžek: 183,1 až 216,6 g, to je 82 až 97% peptidyl-pryskyřice

P ř í k l a d 2

N-benzyloxykarbonyl-izoleucyl-glutaminyl-asparaginyl-S-benzylcysteinyl-prolyl-leucyl--glycyl-copoly(1%-divinylbenzen-styren)

Příprava aktivovaného derivátu aminokyseliny při jednotlivých kopulacích:

	1. kopulace			2. kopulace			aktivace ve směsi
	g Boc-AMK	g HOBT	g DCC	g Boc-AMK	g HOBT	g DCC	CH2Cl2-DMF
Boc-Leu.H2O	49,86	27,0	41,2				4-1
Boc-Pro	43,06	27,0	41,2				3-1
Boc-Cys(Bzl)	62,2	27,0	41,2	31,16	13,5	20,6	3-1
Boc-Asn	46,4	27,0	41,2	23,30	13,5	20,6	1-1
Boc-Gln	49,2	27,0	41,2	24,7	13,5	20,6	1-1
Z-Ile.DCHA	111,72	33,7	51,5				3-1

Do reakční nádoby pro syntézu peptidů v pevné fázi se umístí 100 g esterifikované pryskyřice, obsahující cca 1,0 mmol Boc-Gly/g pryskyřice. Další postup je analogický jako v příkladu 1. Výtěžek: 147 až 174 g, to je 82 až 97% peptidyl-pryskyřice.

P ř í k l a d 3

N-benzyloxykarbonyl-S-benzylcysteinyl-O-methyltyrosyl-izoleucyl-glutaminyl-asparaginyl--S-benzylcysteinyl-prolyl-leucyl-glycyl-copoly(1%-divinylbenzen-styren).

Příprava aktivovaného derivátu aminokyseliny při jednotlivých kopulacích:

	1. kopulace			2. kopulace			aktivace ve směsi
	g Boc-AMK	g HOBT	g DCC	g Boc-AMK	g HOBT	g DCC	CH2Cl2-DMF
Boc-Leu.H2O	49,86	27,0	41,2				4-1
Boc-Pro	43,06	27,0	41,2				3-1
Boc-Cys(Bzl)	62,2	27,0	41,2	31,16	13,5	20,6	3-1
Boc-Asn	46,4	27,0	41,2	23,30	13,5	20,6	1-1
Boc-Gln	49,2	27,0	41,2	24,7	13,5	20,6	1-1
Boc-Ile.DCHA	103,15	33,7	51,5				1-1
Boc-Tyr(Me).DCHA	197,0	55,8	85,1	98,5	27,9	42,6	1-1
Z-Cys(Bzl)	69,0	27,0	41,2	41,4	16,2	24,7	1-1

Do reakční nádoby pro syntézu peptidů v pevné fázi se umístí 100 g esterifikované pryskyřice, obsahující cca 1,0 mmol Boc-Gly/g pryskyřice. Další postup je analogický jako v příkladu 1. Výtěžek: 177,4 až 209,8 g, to je 82 až 97% peptidyl-pryskyřice.

Zkratky a symboly použité v textu

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny aminokyseliny konfigurace L- a jejich zkratky odpovídají používanému názvosloví.

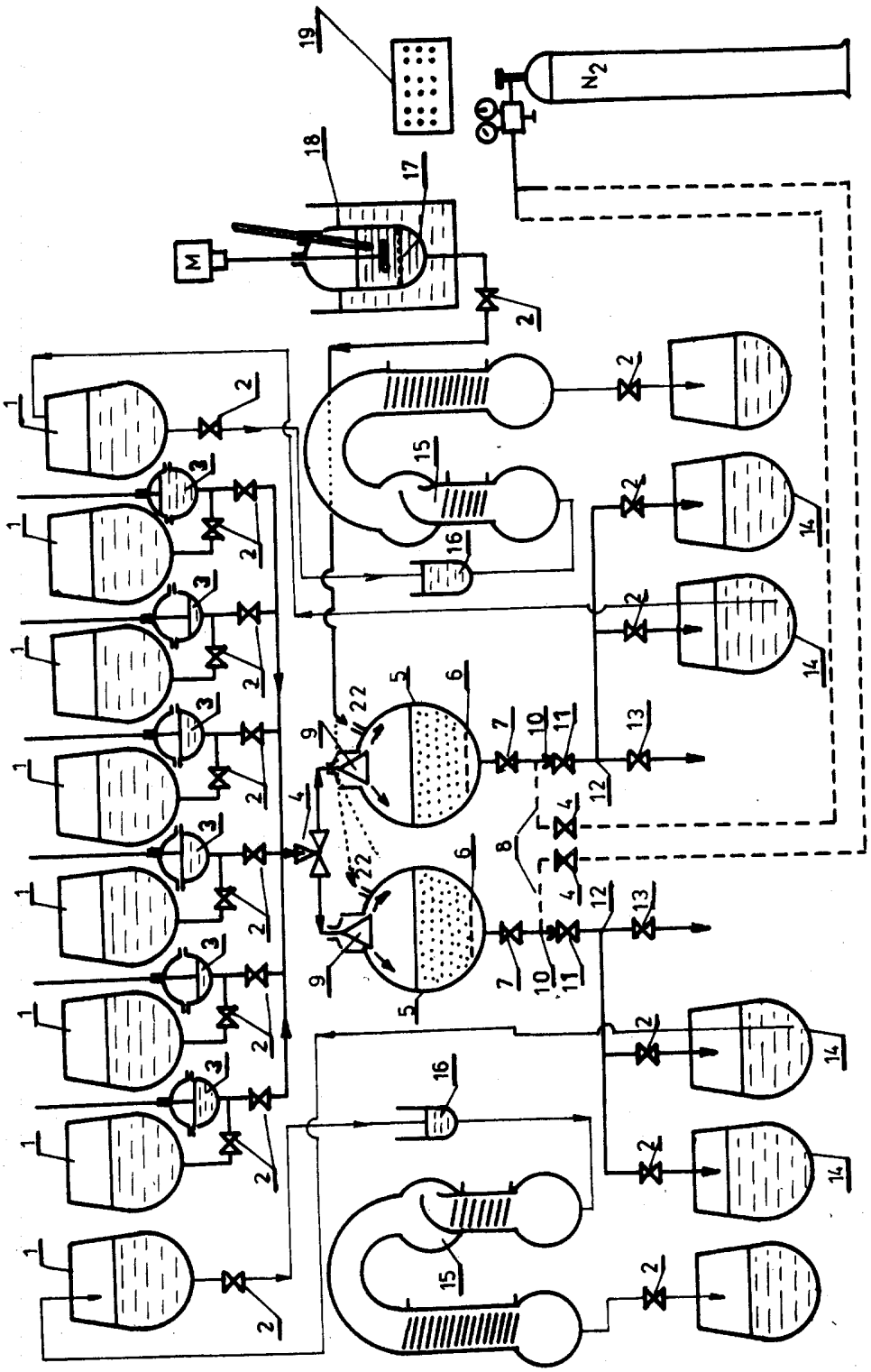
Gly	glycin
Asn	asparagin
Cys	cystein
Gln	glutamin
D-Arg	D-arginin
Mpa	kyselina beta-merkaptopropionová
Phe	phenylalanin
Tyr	tyrosin
Leu	leucin
Ile	isoleucin
Pro	prolin
Boc	terc.-butyloxykarbonyl
Z	benzyloxykarbonyl
Bzl	benzyl
Tos	p-toluensulfonyl
Me	methyl
TEA	triethylamin
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DCHM	dicyklohexylmočovina
DMF	dimethylformamid
DCM	dichlormethan
Boc-AMK	Boc-derivát aminokyseliny
HOBt	N-hydroxybenztriazol
DCHA	dicyklohexylamin
HCl	chlorovodík
CH_2Cl_2	dichlormetan

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

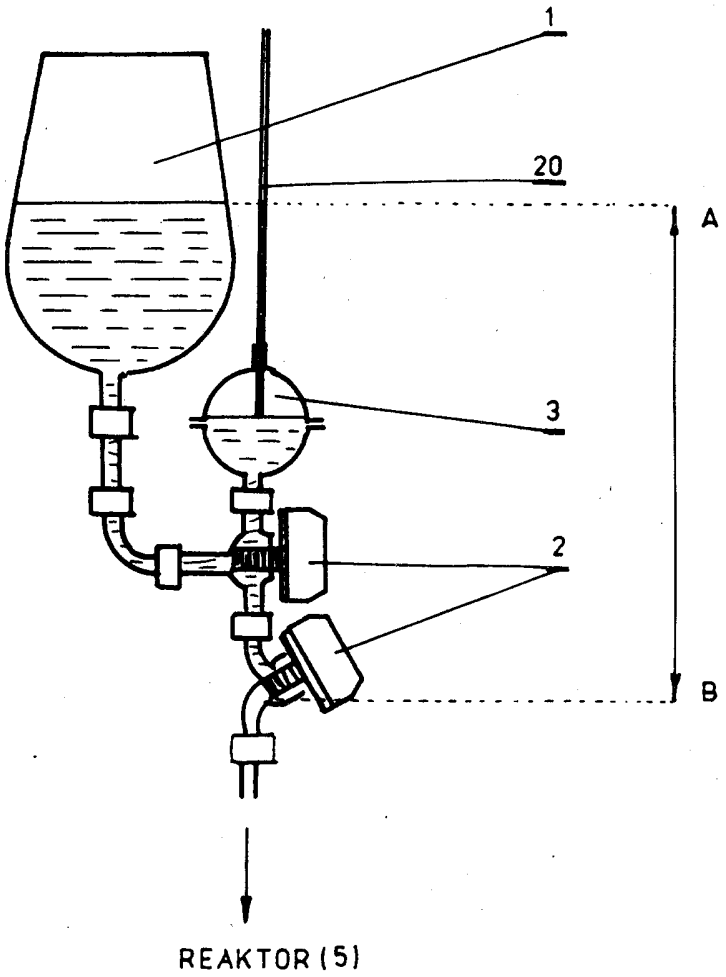
1. Zařízení pro automatickou výrobu peptidů na pevném nosiči, skládající se z nádob reakčních, zásobních, odpadních a odměřovacích, soustavy ventilů a potrubí, vyznačující se tím, že zásobníky (1) s kapilárními odměrkami (3) jsou přes automatické teflonové ventily (2) a vícecestný ruční ventil (4) spojeny s paralelně zapojenými reaktory (5), které jsou přes uzavírací kohouty (7) a automatické teflonové ventily (11) a (2) spojeny s odpadními nádobami (14), z nichž některé jsou přes regenerační odparky (15) a automatický dávkovač (16) spojeny zpět se zásobníky (1), přičemž reaktory (5) jsou opatřeny přívodem inertního míchacího média, s výhodou dusíku (8) a jsou napojeny na pomocný aktivační reaktor (17), přičemž automatický chod zařízení je zajištěn počítačovým ovládačem (19).

2. Zařízení podle bodu 1, vyznačující se tím, že skleněné reaktory (5) mají kulový tvar a jsou opatřeny oplachovacím zařízením (9), plnicím hrdlem (22), umístěným v horní části reaktorů (5), přičemž uvnitř reaktorů (5) je u dna skleněná frita (6) a reaktory jsou v dolní části opatřeny uzavíracím kohoutem (7), pod kterým je přívod inertního míchacího média, s výhodou dusíku (8).

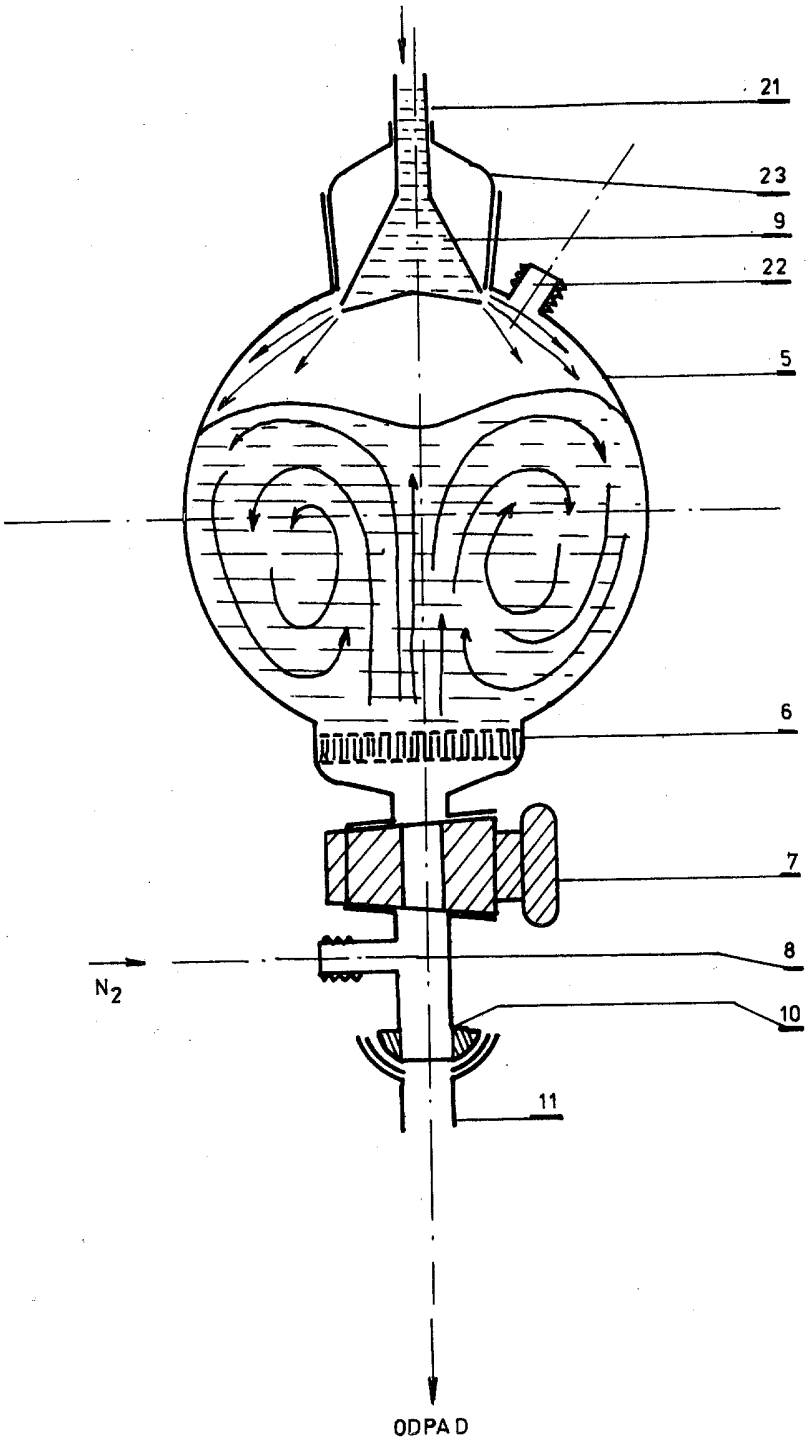
3 výkresy



OBR. 1



OBR. 2



OBR. 3