

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391526** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки  
**2023.08.08**(51) Int. Cl. *C07H 1/00* (2006.01)  
*C07H 21/00* (2006.01)  
*B01J 8/00* (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
**2021.12.14**(54) **СИНТЕЗАТОР ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ВИБРИРУЮЩИМ ПСЕВДООЖИЖЕННЫМ СЛОЕМ**(31) **63/127,269**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.12.18****Браден Тимоти Майкл, Джонсон**(33) **US****Мартин Дэвид, Сунь Вэймин, Вебстер**(86) **PCT/US2021/063185****Люк Филип, Вэй Юйфэй, Зелински**(87) **WO 2022/132681 2022.06.23****Джессика Энн (US)**

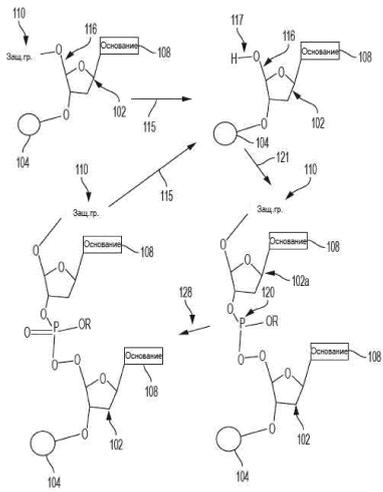
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

**ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)****Гизатуллина Е.М., Гизатуллин****Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,****Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.****(RU)**

(57) Способ и устройство для построения олигонуклеотида на твердофазной смоле в реакторе с фильтром, при этом предложенный способ и устройство используют в качестве системы твердофазного синтеза. В рамках предложенного способа твердофазного синтеза удаляют защитную группу из 5'-положения олигонуклеотида, присоединенного к твердофазной смоле, а затем добавляют раствор активированного амидита (фосфоамидита). Раствор активированного амидита течет вверх и вниз или псевдоожижается и смешивается с гранулами смолы внутри реактора со слоем и реагирует в 5'-положении олигонуклеотида, при этом фосфорная линкерная связь, которая присутствует в амидите, содержит атом Р в степени окисления III. Как только раствор активированного амидита прореагировал, атом Р переходит из степени окисления III в степень окисления V. Любая из реакций, включая деблокирование, сочетание, окисление, сульфирование или кэпирование, может быть выполнена в псевдоожиженном слое или при перемешивании для обеспечения полного контакта между реагентами и смолой. Перед промывкой реагенты сливают из реактора через фильтр, расположенный на дне. Слой смолы является плоским и не имеет каналов благодаря псевдоожижению или перемешиванию перед промывками, и может быть подвергнут повторному псевдоожижению во время любой из промывок. Распылительный конус или другой распределитель обеспечивает равномерное распределение реагентов или промывочных растворителей поверх слоя смолы, не нарушая плоское равномерное распределение смолы в радиальном направлении. Промывку после той или иной реакции можно разделить на несколько отдельных частей. Более чистая часть промывочных растворов после конкретной реакции в одном цикле может быть собрана в резервуаре для хранения и использована в качестве первых промывок после реакции в следующем цикле. Интегрированная в процесс многократная промывка может быть использована для обеспечения более эффективного использования промывочного растворителя. Избыточный раствор реагента, используемый для реакции деблокирования, рециркулируют из одного фосфорамидитного цикла и повторно используют в следующем, что делает использование деблокирования более эффективным.

**A1****202391526****202391526****A1**



# СИНТЕЗАТОР ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ВИБРИРУЮЩИМ ПСЕВДООЖИЖЕННЫМ СЛОЕМ

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к новой системе и способу синтетического производства олигонуклеотидов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к устройству и способу, в которых используют пульсирующий поток или барботаж газа для создания псевдоожигенного слоя как части твердофазного синтеза олигонуклеотидов (SPOS), и полностью сливают жидкость из твердой смолы после каждой стадии реакции и  
10 промывки.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Твердофазный синтез олигонуклеотидов («SPOS») представляет собой способ и систему, наиболее часто используемые для синтеза олигонуклеотидов. SPOS выполняют на  
15 твердофазной среде, которая обычно представляет собой твердую подложку, которая обычно изготовлена из сфер с контролируемым размером пор (CPG) из стекла или макропористого полистирола (MPPS). SPOS представляет собой твердофазный синтез олигонуклеотидов с использованием строительных блоков, представляющих собой различные производные нуклеозидов, наиболее распространенными из которых являются  
20 фосфорамидиты. В частности, исходный фосфорамидитный строительный блок присоединяют к твердой фазе, а затем последовательно добавляют каждый нуклеозид (фосфорамидит) и обеспечивают его сочетание с фосфорамидитным строительным блоком до получения требуемой молекулы. Другими словами, добавляют и присоединяют один  
25 фосфорамидит (обычно в положении 5'-концевого ОН), затем добавляют следующий фосфорамидит и т.д., тем самым увеличивая цепь до тех пор, пока не будет получена требуемая последовательность. На каждом из аминных оснований олигонуклеотидов, а также на фосфоре используют защитные группы, поэтому функциональные группы могут выдерживать кислые и нейтральные условия, используемые в цикле SPOS. После  
30 получения олигонуклеотидной последовательности отщепляют полученную молекулу от твердой подложки и полностью снимают защиту с получением требуемого олигонуклеотида.

В процессе SPOS для присоединения одного фосфорамидита к цепи обычно необходимо протекание четырех химических реакций. Первой стадией является стадия «деблокирования», которая обычно представляет собой реакцию детритилирования. В  
35 частности, 5'-гидроксильная группа нуклеотида защищена кислотонеустойчивой защитной

группой, такой как DMT (4,4'-диметокситриил). Эту защитную группу удаляют с помощью непрерывного потока раствора кислоты или посредством добавления кислоты в растворитель. Кислота может быть, например, трихлоруксусной кислотой (TCA), дихлоруксусной кислотой (DCA) или какой-либо другой кислотой, которая содержится в инертном растворителе, таком как толуол или дихлорметан, или в других растворителях. В некоторых вариантах реализации используют 2% TCA, 3% DCA или 10% DCA в толуоле. Для защитной группы DMT во время такой реакции «деблокирования» образовавшийся катион DMT оранжевого цвета вымывают посредством добавления промывочного раствора. Соответственно, эта стадия приводит к получению связанного с твердой подложкой предшественника олигонуклеотида, несущего свободную 5'-концевую гидроксильную группу.

Затем, по завершении стадии деблокирования выполняют стадию «сочетания». Сочетание включает добавление раствора активированного фосфорамидита в растворителе (таком как, например, раствор 0,02–0,2 М раствора фосфорамидита в ацетонитриле (ACN) (или безводном ACN)). Активированный фосфорамидит взаимодействует и связывается со свободной 5'-концевой гидроксильной группой, с которой ранее была снята защита. Обычно, как известно в данной области техники, раствор фосфорамидита можно «активировать» добавлением катализатора, который облегчает реакцию сочетания. Известно, что различные катализаторы «активируют» фосфорамидит, включая различные соединения азота или имидазола. Часто используют более одного эквивалента катализатора, поскольку кислая природа катализатора способствует нейтрализации побочного продукта, диизопропиламина, образующегося в реакции сочетания. По завершении сочетания любые несвязанные реагенты и побочные продукты удаляют промывкой.

После стадии сочетания следующей стадией SPOS является окисление, тиолирование (также называемое сульфированием) или «кэпирование». Кэпирование выполняют потому, что небольшой процент групп 5'-ОН, связанных с твердой подложкой (от 0,1 до 1% или более), остается непрореагировавшим и должен быть заблокирован от дальнейшего удлинения цепи, чтобы предотвратить образование олигонуклеотидов с делецией внутреннего основания, обычно называемых (n-1), (n-2), (n-3) и т.д. шортмерами. Непрореагировавшие 5'-гидроксигруппы в значительной степени ацетируются кэпирующей смесью. Благодаря кэпированию таких непрореагировавших групп ОН, указанные примеси могут быть легче отделены от требуемого продукта методом хроматографии. Аналогичным образом, если в результате реакции сочетания образуются другие нежелательные продукты (например, продукты реакции О в гуанозинном

основании или другие химические вещества), такие нежелательные продукты также блокируют (кэпируют) от дальнейшего взаимодействия, чтобы их можно было легче отделить на последующих стадиях очистки. В некоторых вариантах реализации стадия кэпирования включает обработку материала, связанного с твердой подложкой, смесью уксусного ангидрида и 1-метилимидазола. Можно использовать и другие кэпирующие реагенты.

На стадии окисления связанный фосфорамидит, вступающий в реакцию с 5'-концевой ОН-группой, образует фосфитную триэфирную связь (например, в которой атом Р находится в степени окисления +3). Такая фосфитная триэфирная связь не является природной и имеет ограниченную стабильность в условиях синтеза олигонуклеотидов. Таким образом, атом Р будет окисляться до более стабильной степени окисления +5 при добавлении окислителей, таких как йод и вода, в присутствии слабого основания (пиридина, лутидина или коллидина). В такой реакции происходит окисление фосфитного сложного триэфира в тетракоординированный фосфатный сложный триэфир, защищенный предшественник встречающейся в природе межнуклеозидной фосфатной диэфирной связи. Окисление можно проводить в безводных условиях с использованием трет-бутилгидропероксида или (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил)оксазиридина (CSO). В других вариантах реализации вместо окисления проводят сульфирование до фосфотиолатного линкера. Специалистам в данной области техники понятно, что некоторые варианты реализации SPOS могут быть разработаны наилучшим образом, если стадия кэпирования происходит после такой стадии окисления или сульфирования, или наоборот. Кроме того, специалистам в данной области техники понятно, что некоторые варианты реализации SPOS могут быть разработаны наилучшим образом, если стадия кэпирования исключена из некоторых циклов, когда ожидается высокая степень превращения.

По завершении описанных четырех стадий (деблокирования, сочетания, окисления или сульфирования и кэпирования), фосфорамидитный строительный блок становится добавленным в растущую цепь. Понятно, что связанный фосфорамидитный строительный блок имеет свою собственную защитную группу DMT, которая защищает 5'-концевую группу ОН. Таким образом, затем описанный процесс можно повторять и добавлять еще одну фосфорамидитный фрагмент до тех пор, пока цепь не достигнет требуемой длины.

Как только цепь достигнет требуемой длины, защитные группы олигонуклеотида могут быть удалены, а олигонуклеотид может быть отщеплен от смолы и высвобожден в раствор. В некоторых случаях защитные группы аминов нуклеозидов и 2-цианоэтилфосфатные защитные группы полностью снимают в одной и той же реакции гидролитического расщепления, катализируемой основанием. Для такой стадии

расщепления/снятия защиты обычно используют водные растворы аммиака, смеси аммиака и метиламина и другие. Такие условия также обеспечивают эффективный гидролиз 3'-линкера и отщепление олигонуклеотида от смолы.

Однако побочный продукт акрилонитрил, который образуется во время аммонолиза 2-цианоэтильных защитных групп, может алкилировать фрагменты аминокислот, образуя потенциально проблемные аддукты. По этой причине иногда желательно селективно снять защиту с фосфатов посредством обработки безводным раствором вторичного амина (например, диэтиламина), пока олигонуклеотид еще связан со смолой. После смывания побочного продукта, акрилонитрила, растворителем, можно отщепить олигонуклеотид и снять защиту в водном растворе аммиака, не опасаясь образования аддукта акрилонитрила. Несмотря на то, что описанный способ SPOS используют в промышленности, и он до сих пор является стандартом в синтезе олигонуклеотидов, он явно имеет недостатки, главным из которых является его дороговизна, образование большого количества отходов и ограниченная масштабируемость. Поскольку требуется несколько стадий, такой процесс очень дорог и приводит к использованию большого количества растворителей и образованию отходов. Усугубляет ситуацию то, что многие из данных растворителей не являются экологически безопасными. Кроме того, для многих твердых подложек SPOS количество материала, которое может быть загружено на подложку, невелико, поэтому для производства промышленных объемов требуется слишком много партий. Кроме того, размер партии в обычных реакторах SPOS с поршневым потоком с уплотненным слоем ограничен, поскольку высота слоя смолы ограничена вследствие перепада давления жидкости, протекающей вниз сквозь слой, а диаметр ограничен вследствие проблем с радиальным распределением реагентов и поддержанием равномерной высоты слоя по всему сечению. Кроме того, для каждого олигонуклеотида необходима защитная группа, что увеличивает общую стоимость производства.

Возможно, самым большим недостатком SPOS является его неэффективность. Поскольку для добавления одного фосфорамидита требуется четыре реакции, то если хотя бы один тип реакции имеет низкую степень превращения в каждом цикле, это резко влияет на общий выход процесса. Кроме того, растворы, используемые в четырех реакциях, обычно добавляют к смоле посредством их введения в верхнюю часть сосуда и обеспечения возможности их взаимодействия по мере прокачивания в нижнюю часть сосуда и из нее. Такой процесс обычно приводит к неравномерному контакту жидкой и твердой фаз, особенно когда в слое смолы образуются каналы, что приводит к низкой эффективности реакции. Таким образом, для достижения полноты протекания реакций, тщательной промывки и высокого выхода необходим большой избыток реагентов. С учетом реагентов

и промывочных растворов, количество материалов, необходимых для производства промышленных количеств олигонуклеотидов, очень велико. Неравномерный контакт также вызывает неравномерную чистоту по всей емкости реактора, особенно в направлении сверху вниз. Учитывая ограничения масштаба реактора с уплотненным слоем, некоторые продукты из портфолио авторов изобретения потребуют сотни серий синтеза в год. Кроме того, способ SPOS, в котором используют обычные реакторы с уплотненным слоем с нисходящим потоком, не всегда легко поддается гибкому изменению размера партии в одном и том же реакторе, поскольку изменение высоты слоя смолы может приводить к изменению выхода и профиля содержания примесей вследствие неравномерного контакта в направлении сверху вниз. Кроме того, максимальная высота слоя смолы также ограничена вследствие перепада давления в слое, особенно когда частицы полистирольной смолы набухают и одновременно сдавливаются при прохождении растворителей во время течения. Нагрузка (загрузка) на полистирольную смолу ограничена значением примерно 300 мкмоль/г вследствие необходимости ограничения набухания смолы и, следовательно, ограничения перепада давления в слое смолы.

Соответственно, усовершенствование заключалось бы в обнаружении нового способа использования SPOS, который устранял бы один или более из описанных недостатков. Особым усовершенствованием было бы обнаружение такой системы SPOS, которую можно использовать в промышленных масштабах для получения больших объемов олигонуклеотидов, например, несколько тонн в год. Еще большим достижением была бы большая экологичность такой системы и снижение производственных затрат, а также более высокая общая эффективность. Предложенные варианты реализации обеспечивают решение одной или более из указанных проблем.

## 25 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложенные варианты реализации включают способ присоединения фосфорамидита к твердофазной смоле в реакторе со слоем, в котором защитная группа удалена из 5'-положения олигонуклеотида, и сочетание раствора активированного амидита с незащищенной группой, при этом раствор активированного амидита содержит амидит и обеспечивает псевдооживление смолы в реакторе. Псевдооживление может происходить в результате принудительного течения жидкости вверх и вниз внутри реактора со слоем, барботирования инертного газа или другого типа перемешивания для создания взвеси. Амидит реагирует в 5'-положении олигонуклеотида.

В дополнение к реакции сочетания растворы реагентов для деблокирования, окисления, тиолирования и кэпирования могут быть псевдооживлены со смолой для

обеспечения полного контакта жидкости с твердым веществом и повторного оседания слоя смолы без каналов. После псевдооживления может следовать реакция при поршневом движении потока реагента в направлении вниз через слой смолы, что типично для обычного SPOS. Такая фаза псевдооживления, за которой следует фаза поршневого движения потока, может быть выполнена для промывок растворителем после каждой реакции. Таким образом, большая часть набухания и усадки смолы может происходить во время фазы псевдооживления при контакте твердой и жидкой фаз, когда выгодно преодолевать перепад давления и устранять образование каналов.

## 10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Признаки и преимущества настоящего изобретения станут более очевидными для специалистов в данной области техники при рассмотрении следующего подробного описания в сочетании с сопроводительными фигурами.

15 **Фиг. 1** представляет собой схематический вид реакций, которые проводят в системе синтеза олигонуклеотидов SPOS;

**Фиг. 2** представляет собой схематический вид системы SPOS;

**Фиг. 3** представляет собой схематический вид маломасштабной установки синтезатора олигонуклеотидов с вибрирующим псевдооживленным слоем;

20 **Фиг. 4** представляет собой график, показывающий высоту слоя смолы в примере 2 в каждом фосфорамидитном цикле;

**Фиг. 5** представляет собой схематический вид полупромышленной установки синтезатора олигонуклеотидов с псевдооживленным слоем;

**Фиг. 6** представляет собой схематический вид молекулы, которая может быть получена с использованием способов, описанных в настоящем документе.

25 **Фиг. 7** представляет собой схематический вид альтернативной экспериментальной установки синтезатора олигонуклеотидов с псевдооживленным слоем;

**Фиг. 8** представляет собой схематический вид альтернативной экспериментальной установки синтезатора олигонуклеотидов с псевдооживленным слоем;

30 **Фиг. 9** представляет собой схематический вид альтернативной полупромышленной установки синтезатора олигонуклеотидов с псевдооживленным слоем;

**Фиг. 10** представляет собой схематический вид молекулы, которая может быть получена с использованием способов, описанных в настоящем документе.

**Фиг. 11** представляет собой схематический вид альтернативной полупромышленной установки синтезатора олигонуклеотидов с псевдооживленным слоем;

**Фиг. 12** представляет собой схематический вид встроенной в процесс многократной системы промывки после деблокирования;

**Фиг. 13** представляет собой схематический вид встроенной в процесс многократной системы промывки после окисления/тиолирования; и

5 **ФИГ. 14-17** представляют собой различные хроматограммы СВЭЖХ полученных примеров.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Описан способ присоединения олигонуклеотида к твердофазной смоле в реакторе со слоем. Предложенный способ включает удаление защитной группы из 5'-положения олигонуклеотида, присоединенного к твердофазной смоле, добавление раствора активированного амидита в реактор со слоем, при этом раствор активированного амидита содержит амидит и течет (движется) вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдооживается при барботировании азота или другом перемешивании и реагирует в 5'-  
15 положении олигонуклеотида, причем фосфорная линкерная связь, встречающаяся в амидите, содержит атом Р, который находится в степени окисления III, и превращение атома Р из степени окисления III в степень окисления V.

В некоторых вариантах реализации предложенный способ дополнительно включает стадию добавления кэпирующего раствора до или после превращения атома Р из степени  
20 окисления III в степень окисления V, при этом, если связывающий фрагмент не прореагировал с раствором амидита, то кэпирующий раствор кэпирует связывающий фрагмент, так что ни один дополнительный амидит не может быть присоединен к связывающему фрагменту, при этом кэпирующий раствор течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдооживается, или смешивается при барботировании азота или  
25 другом перемешивании. В некоторых вариантах реализации кэпирование осуществляют только для некоторых фосфорамидитных циклов.

В дополнительных вариантах реализации предложенный способ дополнительно включает стадию удаления раствора активированного амидита из реактора со слоем посредством пропускания раствора амидита через фильтр, расположенный на дне реактора  
30 со слоем.

Могут быть осуществлены дополнительные варианты реализации, которые включают дополнительную стадию добавления первого промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление первого промывочного раствора происходит после удаления защитной группы. В дополнительных вариантах реализации предложенный способ  
35 дополнительно включает стадию добавления второго промывочного раствора в реактор со

слоем, при этом добавление второго промывочного раствора происходит после добавления в реактор со слоем раствора активированного амидита. Первый и второй (растворы) могут протекать вверх и вниз или смешиваться с пузырьками газа или другим перемешиванием внутри реактора со слоем, и при этом предложенный способ дополнительно включает стадию раздельного удаления первого и второго промывочных растворов из реактора со слоем посредством пропускания первого и второго промывочных растворов через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем. Может быть использовано большее количество промывочных сегментов, и это может быть выполнено интегрированным способом многократной промывки, описанным в настоящем документе.

10 В дополнительных вариантах реализации стадия добавления второго промывочного раствора происходит перед стадией превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V. В других вариантах реализации присутствует стадия добавления третьего промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление третьего промывочного раствора происходит после превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V. В других вариантах реализации третий промывочный раствор течет вверх и вниз или псевдооживается, или смешивается при барботировании азота или другом перемешивании внутри реактора со слоем, и при этом предложенный способ дополнительно включает стадию удаления третьего промывочного раствора из реактора со слоем посредством пропускания третьего промывочного раствора через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем. Может быть использовано большее количество промывочных сегментов, и это может быть выполнено интегрированным способом многократной промывки, описанным в настоящем документе. В других вариантах реализации защитная группа представляет собой группу DMT, и при этом удаление защитной группы включает взаимодействие 5'-положения нуклеотида с активирующим раствором, содержащим кислоту в растворителе. Кроме того, могут быть осуществлены дополнительные варианты реализации, включающие стадию удаления активирующего раствора из реактора со слоем посредством пропускания активирующего раствора через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем. В некоторых вариантах реализации восходящий и нисходящий поток внутри реактора со слоем обеспечен посредством повышения давления в верхней части реактора. В дополнительных вариантах реализации смешивание твердого вещества и жидкости в псевдооживленном слое внутри реактора со слоем осуществляют посредством введения азота или другого газа в нижней части реактора или применения перемешивания какого-либо другого типа. В некоторых вариантах реализации во время стадии деблокирования не осуществляют псевдооживление или перемешивание и используют только поршневой поток через слой смолы.

Предусмотрены дополнительные варианты реализации, в которых более чистые фракции промывочных растворителей рециркулируют из одного фосфорамидитного цикла и повторно используют в следующем цикле. Разработаны дополнительные варианты реализации, в которых более чистую часть раствора реагента, используемую для реакции деблокирования, рециркулируют из одного фосфорамидитного цикла и повторно используют в следующем цикле. Предусмотрены дополнительные варианты реализации, которые включают встроенную в процесс многократную промывку, описанную в настоящем документе.

Также описана система для присоединения олигонуклеотида к твердофазной смоле. Предложенная система содержит реактор со слоем и раствор активированного амидита, при этом раствор активированного амидита содержит амидит и течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдоожигается при барботировании азота или другом перемешивании. Система может иметь реактор со слоем, содержащий выпускное отверстие, которое обеспечивает возможность подачи сжатого газа в реактор со слоем, при этом сжатый газ или какой-либо другой тип перемешивания вызывает смешивание раствора амидита с твердыми частицами внутри реактора со слоем. В других вариантах реализации выпускное отверстие расположено в нижней части реактора со слоем. Реактор со слоем может находиться под давлением из верхней части реактора со слоем, при этом давление обеспечивает принудительное течение амидита вверх и вниз внутри реактора со слоем. В некоторых вариантах реализации отсутствует течение жидкости в реакторе вверх и вниз, и смешивание жидкости и твердых веществ в реакторе происходит в результате барботирования инертного газа из нижней части реактора.

Для облегчения понимания принципов настоящего изобретения будут сделаны ссылки на варианты его реализации, проиллюстрированные с помощью графических материалов, а для их описания будут использованы конкретные формулировки. Тем не менее, следует понимать, что таким образом не предусмотрено ограничение объема настоящего изобретения.

На фиг. 1 показана схема, представляющая реакции, происходящие в системе SPOS. В частности, имеется олигонуклеотид 102, присоединенный к смоле 104. Как показано на фиг. 1, олигонуклеотид 102 может быть ковалентно присоединен к смоле 104 через кислородную (простую эфирную) линкерную связь. Конечно, также могут быть использованы другие типы и способы, с помощью которых олигонуклеотид может быть присоединен к смоле 104. (Зона смолы в данном контексте иногда называется слоем смолы). Олигонуклеотид 102 содержит основание 108, такое как основание, которое обычно ассоциируется с ДНК или РНК. Основание 108 может быть защищено (например, может

иметь одну или более защищенных функциональных групп основания, как известно в данной области техники).

Олигонуклеотид может содержать защитную группу 110, которая защищает группу атома О в 5'-положении 116. Как показано в реакции 115 (обозначенной стрелкой), атом О в 5'-положении 116 может быть лишен защиты, так что ОН-группа 117 оказывается в 5'-положении 116. В некоторых вариантах реализации защитная группа 110 представляет собой группу DMT, и при этом удаление защитной группы включает взаимодействие 5'-положения олигонуклеотида с активирующим раствором, содержащим кислоту в растворителе.

После снятия защиты с 5'-положения 116 олигонуклеотид 102 может реагировать с амидитом 102а. Амидит 102а будет реагировать с группой ОН 117, лишенной защиты, через Р-линкерную связь. Более конкретно, атом Р 120 будет реагировать с группой ОН 117 с образованием связи между олигонуклеотидом и фосфорамидитом 120, 120а. Такая реакция известна как реакция сочетания 121 (обозначена стрелкой). Атом Р 120 находится в степени окисления три (3) (также обозначается как «III»). В результате реакции сочетания 121 олигонуклеотид и фосфорамидит 120, 120а соединяются друг с другом, и один из олигонуклеотидов остается связанным со смолой 104.

Затем может происходить стадия окисления 128 (обозначенная стрелкой), которая обеспечивает превращение атома Р 120 из степени окисления III в степень окисления «V» (пять или 5). Специалистам в данной области техники известны условия, которые используются для осуществления такого окисления. Несмотря на то, что это не показано на фиг. 1, стадия кэпирования также может быть выполнена либо до, либо после реакции окисления 128.

После реакции окисления 128 добавленный амидит 120а также имеет защитную группу 110. Таким образом, может возникнуть новый «цикл» или «серия» реакций. Они могут включать простое повторение перечисленных выше реакций для присоединения следующего амидита в цепь. В частности, защитная группа 110 амидита 120а может быть удалена (снята защита), а затем, при необходимости, может быть проведена реакция сочетания 121 и реакция окисления 128 (и/или реакция кэпирования). Такой итеративный процесс можно повторять столько раз, сколько необходимо для получения олигонуклеотидной цепи требуемой длины. Альтернативно, 128 может быть реакцией сульфирования (также называемого тиолированием), которая обеспечивает превращение атома Р 120 из степени окисления III в степень окисления «V» (пять или 5), при этом атом Р связывается с атомом серы (S) двойной связью P=S.

На фиг. 2 показано схематическое изображение системы 200 реакторов SPOS.

Система 200 содержит реактор 202 (также известный как слой реактора), в котором находится смола 204. Смола 204 аналогична смоле 104, описанной выше. Таким образом, как описано выше, смола 204 содержит олигонуклеотидную цепь, которая может расти до требуемой длины (как это известно для синтеза SPOS). Реактор 202 содержит фильтр 206, который может быть расположен на дне реактора 202. В варианте реализации, показанном на фиг. 2, газовая камера 210 расположена под фильтром 206, как и выпускное отверстие 212. Выпускное отверстие 212 обеспечивает возможность выпуска жидкости и/или газа из реактора 202. В других вариантах реализации выпускное отверстие 212 и газовая камера 210 могут быть одним и тем же отверстием. В варианте реализации, изображенном на фиг. 2, выпускное отверстие 212 показано как расположенное в реакторе. В дополнительных предпочтительных вариантах реализации выпускное отверстие может выходить из фильтра 206. Газовая камера может быть просто технологическим трубопроводом или технологическим трубопроводом, выходящим из нижней части реактора под фильтром.

Реактор 202 также содержит еще одно впускное отверстие 220. В конкретном варианте реализации, показанном на фиг. 2, имеется несколько впускных отверстий 220a, 220b, 220c, 220d, 220e. Верхняя часть реактора с отверстиями 220a, 220b, 220c, 220d, 220e и нижняя часть реактора с отверстиями 206, 210 и 212 могут быть отдельными сосудами с трубками и необязательным вентилем между первым сосудом, представляющим собой зону подачи сырья, и вторым сосудом, представляющим собой зону фильтрующего реактора. Конечно, специалистам в данной области техники понятно, что можно использовать большее или меньшее количество отверстий 220. Фактически, в некоторых вариантах реализации можно использовать одно отверстие. Отверстие 220a можно использовать для подачи промывочного раствора 240 (графически представленного прямоугольником) в реактор 202. Отверстие 220b можно использовать для подачи раствора активированного амидита 242 (графически представленного прямоугольником) в реактор 202. Отверстие 220c можно использовать для подачи кэпирующего раствора 244 (графически представленного прямоугольником) в реактор 202. Отверстие 220d можно использовать для подачи окислительного раствора 246 (для окисления или тиолирования, графически представленного прямоугольником) в реактор 202. Отверстие 220e можно использовать для подачи раствора 248 для снятия защиты (графически представленного прямоугольником) в реактор 202. Могут быть разработаны другие варианты реализации, в которых имеется только одно отверстие 220, и все растворы поступают в реактор 202 через одно впускное отверстие 220.

Со ссылкой на обе фиг. 1 и 2 далее будет описано применение системы 200 SPOS, чтобы показать, как собирают и эксплуатируют реактор 200 (также известный как реактор

со слоем). Как отмечено выше, твердая подложка 204 является твердой подложкой для присоединения фосфоамидитов 102 к растущему олигонуклеотиду. Используя отверстие 220e, раствор 248 для снятия защиты используют для удаления защитной группы 110 из 5'-положения 116 олигонуклеотида 102, прикрепленного к твердой подложке 204. Раствор 248 для снятия защиты будет стекать через твердую подложку 204, а затем через фильтр 206.

Первоначально перепад давления над и под фильтром 206 невелик, например составляет примерно 0 фунтов/кв.дюйм (фунтов на квадратный дюйм по манометру). Затем в верхней части реактора 200 повышают давление (через отверстие 252 для повышения давления). Обычно указанное давление составляет примерно 15 фунтов/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.), но могут быть использованы и другие значения давления. Такое повышение давления обеспечивает продавливание части жидкого раствора 248 для снятия защиты вниз через твердую подложку 204 и через фильтр 206 (как показано стрелкой 265). После того как раствор 248 продавлен вниз через фильтр 206, давление в газовой камере или технологическом трубопроводе 210 под фильтром 206 приближается к значению 15 фунтов/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.). Затем в системе 200 вентилируют верхнюю часть фильтра 206 (например, через отверстие 252 для повышения давления (или какой-либо другой аналогичный механизм/отверстие), и под давлением примерно 15 фунтов/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.), оставшимся под фильтром 206, продавливают раствор 248 обратно вверх через фильтр 206 и твердую подложку 204 (как показано стрелкой 270) до тех пор, пока давление выше и ниже снова не уравнивается на значении примерно 0 фунтов/кв.дюйм изб.

Используя такое повышение давления, можно обеспечить принудительное движение раствора 248 вверх и вниз через реактор 200 столько раз (и со скоростью, используемой для потока), сколько необходимо. (Такая разность давлений может быть использована для того, чтобы все растворы, добавляемые в реактор 202, текли одинаково). В некоторых вариантах реализации можно обеспечивать движение раствора 248 вверх и вниз каждые 10-15 секунд. В других вариантах реализации система 200 сконструирована таким образом, что раствор 248 будет течь вниз и вверх один или более раз для псевдооживления содержимого реактора 202, а затем медленно стекать вниз для продолжения реакции в обычном режиме поршневого типа. Благодаря тому, что раствор 248 течет вверх и вниз, раствор 248 будет многократно контактировать с твердой подложкой 204, облегчая реакцию с полным контактированием и тщательным распределением твердой и жидкой фаз. Это также уменьшает падение давления при нисходящем движении жидкости, поскольку значительная часть набухания и усадки происходит во время псевдооживления. В других вариантах реализации через сетку фильтра

в нижней части реактора продавливают лишь небольшую часть жидкости, при этом через сетку фильтра в нижней части подают азот, обеспечивая псевдооживление и смешивание слоя твердой подложки с жидкостью в реакторе вследствие образования пузырьков газа. После псевдооживления потоком жидкого реагента или инертного газа, восходящим из нижней части реактора, в следующей части для реакции снятия защиты можно использовать нисходящий поток раствора реагента с регулируемой скоростью, проходящий через слой твердой подложки, как в обычном способе SPOS с уплотненным слоем. Однако такой вариант реализации может вообще не обеспечивать смешивание раствора 248 в реакторе, а обеспечивать только протекание поршневого потока через твердую подложку и из фильтра реактора 206.

Раствор 248 для снятия защиты может быть удален из реактора 202 через отверстие 212. Повышение давления через отверстие 252 для повышения давления может способствовать удалению раствора 248 для снятия защиты, и жидкость может быть откачана из нижней части реактора 202 через 212 с регулируемой скоростью. Первый промывочный раствор 240а может быть добавлен через отверстие 220а. Течение промывочного раствора 240а вверх и вниз по реактору 202 можно обеспечивать с использованием перепадов давления, описанных выше, или он может быть смешан с твердой подложкой посредством барботирования газа вверх через дно реактора или какого-либо другого способа смешивания, или он может вообще не двигаться вверх и вниз или не смешиваться, а только проходить через твердую подложку в поршневом потоке. При движении промывочного раствора вверх и вниз или псевдооживлении вследствие барботирования газа или другого перемешивания один и тот же раствор контактирует с твердой подложкой 204 один или более раз (и «промывает» ее). Раствор реагента полностью сливают из реактора перед добавлением промывочного растворителя, а промывочный растворитель полностью сливают из реактора перед добавлением следующей жидкости. Это может обеспечивать необходимость меньшего количества промывочного раствора 240а (что снижает затраты, связанные с получением, применением и утилизацией промывочного раствора), по сравнению с обычными процессами SPOS с уплотненным слоем, в которых может происходить обратное смешивание в жидком слое в верхней части слоя твердой подложки во время переключений. Для равномерной подачи промывочного растворителя 240а на всю поверхность твердой подложки может быть использован распределитель, таким образом, чтобы не нарушалась плоскостность слоя твердой подложки. Количество повторений прохождения промывочного раствора вверх и вниз по реактору 202 будет зависеть от конкретной реакции и конкретного цикла. Кроме того, за промывками в псевдооживленном слое могут следовать промывки с поршневым

потоком после того, как промывки в псевдооживленном слое были использованы для устранения набухания и повторного оседания слоя твердой подложки с ровной верхней частью и отсутствием каналов. В качестве альтернативы, все промывки могут быть выполнены поршневым потоком без псевдооживления, если конкретная стадия не вызывает проблем с перепадом давления или образованием каналов. После завершения промывочный раствор 240a может быть выпущен из реактора 202 через выпускное отверстие 212. Специалистам в данной области техники понятно, что при необходимости один или более дополнительных «циклов» или «раундов» промывки могут быть выполнены посредством введения большего количества порций первого промывочного раствора 240a. Кроме того, промывочный раствор может быть интегрирован в многократное повторное использование промывочных растворов из предыдущих циклов, как описано в настоящем документе.

После выполнения первой стадии (или стадий) промывки и удаления первого промывочного раствора 240a (с использованием давления, прокачивания с помощью насоса или другой движущей силы для вытекания жидкости из фильтра) из реактора 202 можно добавлять раствор 242 активированного амидита через впускное отверстие 220b. Раствор 242 активированного амидита 242 содержит амидит 120a и будет течь вверх и вниз через реактор 202 столько раз, сколько необходимо, или смешиваться с твердой подложкой посредством барботирования газа вверх через дно реактора или какого-либо другого способа смешивания. Двигаясь вверх и вниз или смешиваясь, раствор 242 активированного амидита многократно контактирует с олигонуклеотидом 102 на твердой подложке 204, что повышает вероятность реакции сочетания и/или эффективность реакции сочетания. Как подробно описано выше, реакция сочетания включает реакцию амидита в 5'-положении олигонуклеотида с образованием фосфорной линкерной связи атома Р 120. В других вариантах реализации псевдооживление осуществляют барботированием газообразного азота через дно реактора для достижения смешивания твердой и жидкой фаз. То же самое утверждение о барботировании азота через дно реактора для смешивания жидкой и твердой фаз применимо к каждому из следующих описаний псевдооживления в настоящем документе.

После завершения реакции сочетания раствор 242 активированного амидита может быть удален из реактора 202 через выпускное отверстие 212 (под давлением или без него) и может быть добавлен второй промывочный раствор 240b (через отверстие 220a или иным образом). Вторым промывочным раствором 240b может быть таким же раствором, что и первый промывочный раствор 240a, или, в других вариантах реализации, это может быть другая промывочная смесь. Вторым промывочным раствором 240b может течь вверх и вниз по реактору 202 описанным в настоящем документе образом. В качестве альтернативы, второй

промывочный раствор 240b может быть смешан с твердой подложкой посредством барботирования газа вверх через дно реактора или какого-либо другого способа смешивания, или он может протекать через слой твердой подложки в режиме поршневого потока вообще без перемешивания или псевдооживления. Как и в случае с первым промывочным раствором 240a, могут быть разработаны варианты реализации, в которых второй промывочный раствор 240b может выходить из реактора 202 через выпускное отверстие 212, а один или более дополнительных «циклов», «раундов» или «частей» промывки при необходимости могут быть выполнены посредством введения новой (чистой) порции второго промывочного раствора 240b. Могут быть разработаны другие варианты реализации, в которых используют одну порцию второго промывочного раствора 240b.

После удаления окончательного промывочного раствора 240b (под давлением или без него) можно проводить реакцию окисления посредством введения раствора 246 для окисления или тиолирования через впускное отверстие 220d. Как описано выше, реакция окисления обеспечивает превращение атома Р 120 из степени окисления III в степень окисления V. Опять же, можно обеспечивать принудительное движение окислительного раствора 246 вверх и вниз по реактору 202 описанным в настоящем документе образом, что повышает эффективность реакции и может обеспечивать необходимость меньшего количества окислительного раствора 246, или он может быть смешан с твердой подложкой посредством барботирования газа вверх через дно реактора или какого-либо другого способа смешивания, или он может протекать через слой твердой подложки в режиме поршневого потока без смешивания или псевдооживления. Количество повторений восходящего и нисходящего движения, а также время для каждого цикла, как и другие решения, будут варьироваться в зависимости от условий и могут быть изменены специалистами в данной области техники. После псевдооживления восходящим потоком жидкого реагента или инертного газа из нижней части реактора в следующей части реакции окисления может быть использован нисходящий поток раствора окислительного реагента с регулируемой скоростью, проходящий через слой твердой подложки, как в обычном способе SPOS с уплотненным слоем. После завершения реакции окисления окислительный раствор 246 может быть удален из реактора 202 через отверстие 212 (с помощью давления или без него).

После реакции окисления через впускное отверстие 220a (через отверстие 220a или иным образом) может быть введен третий промывочный раствор 240c. Третий промывочный раствор 240c может представлять собой тот же раствор, что и первый промывочный раствор 240a или второй промывочный раствор 240b, или в других вариантах

реализации это может быть другая промывочная смесь. Третий промывочный раствор 240с может двигаться вверх и вниз по реактору 202 способом, описанным в настоящем документе, или он может быть смешан с твердой подложкой посредством барботирования газа вверх через дно реактора или какого-либо другого способа смешивания, или он может  
5 течь через слой твердой подложки в режиме поршневого потока без смешивания или псевдооживления. Опять же, такой восходящий и нисходящий поток, а также полное опорожнение каждой порции жидкости с последующей промывкой поршневым потоком могут обеспечивать более эффективную промывку благодаря устранению образования каналов или может уменьшать проблемы с перепадом давления, обеспечивая возможность  
10 набухания или усадки твердой подложки в псевдооживленном или взвешенном состоянии, и могут уменьшать общее количество необходимого промывочного раствора. Как и в случае первого промывочного раствора 240а и второго промывочного раствора 240b, могут быть разработаны варианты реализации, в которых третий промывочный раствор 240с может выходить из реактора 202 через выпускное отверстие 212, и один или более  
15 дополнительных «циклов», «раундов» или «частей» промывки при необходимости можно выполнить посредством введения дополнительных порций третьего промывочного раствора 240с. Кроме того, промывочный раствор может быть интегрирован в многократное повторное использование промывочных растворов из предыдущих циклов, как описано в настоящем документе. Могут быть разработаны другие варианты реализации,  
20 в которых используют одну порцию третьего промывочного раствора 240с. Как и при всех загрузках промывочной жидкости или реагентов в реактор, можно использовать распределитель для равномерной загрузки промывочного растворителя на всю поверхность твердой подложки таким образом, чтобы не нарушалась плоскостность слоя твердой подложки.

25       Внутри реактора 202 также может происходить реакция кэпирования. Реакция кэпирования может происходить либо до, либо после реакции окисления (т.е. стадии, на которой атом Р превращается из степени окисления III в степень окисления V). Для облегчения реакции кэпирования через впускное отверстие 220с можно добавлять кэпирующий раствор 244. Можно обеспечивать принудительное движение кэпирующего  
30 раствора 244 вверх и вниз по реактору 202 описанным в настоящем документе образом, что повышает эффективность реакции и может обеспечивать необходимость меньшего количества раствора 244. Количество повторений восходящего и нисходящего движения, а также время для каждого цикла, как и другие решения, будут варьироваться в зависимости от условий и могут быть изменены специалистами в данной области техники. В качестве  
35 альтернативы, раствор кэпирующего реагента может быть смешан с твердой подложкой

посредством барботирования газа вверх через дно реактора или какого-либо другого способа смешивания, или он может протекать через слой твердой подложки в поршневом режиме вообще без смешивания или псевдооживления. После псевдооживления восходящим потоком жидкого реагента или инертного газа из нижней части реактора в следующей части

5 реакции кэпирования можно использовать нисходящий поток раствора реагента с регулируемой скоростью через слой твердой подложки, как в обычном способе SPOS с уплотненным слоем. По завершении реакции кэпирования кэпирующий раствор 244 может быть выпущен из реактора 202 через отверстие 212 (с помощью давления или без него).

10 После удаления кэпирующего раствора 244 может быть выполнена стадия промывки. Если бы реакция кэпирования происходила до реакции окисления, это была бы третья промывка; однако если реакция кэпирования происходит после стадии окисления, это будет четвертая стадия промывки. Указанную промывку можно осуществлять таким же образом, как описано в настоящем документе.

После реакции окисления или реакции кэпирования (и промывки) цикл может быть

15 «начат заново» для добавления нового фосфорамидита в растущую цепь. Процесс будет начинаться с реакции снятия защиты (например, добавления раствора для снятия защиты) с последующим осуществлением цикла столько раз, сколько необходимо для получения требуемого продукта.

В некоторых вариантах реализации растворы (такие как промывочные растворы,

20 раствор активированного амидита, раствор для кэпирования, раствор для окисления и/или раствор для снятия защиты) могут выходить из реактора, проходя через фильтр в нижней части реактора. Конечно, можно использовать и другие способы удаления указанных растворов.

В варианте реализации, показанном на фиг. 2, «восходящий и нисходящий» поток

25 через слой реактора осуществляют под давлением, обеспечивающим принудительное движение текучих сред в вертикальном направлении. Однако в настоящем документе термин «восходящее и нисходящее» также включает перемещение жидкости в горизонтальном направлении (например, от одной стороны реактора к другой, через слой) или по диагонали через реактор. Любой тип «колебаний» текучей среды в реакторе включен

30 в понятие «восходящего и нисходящего» потока. Такое перемещение также может быть осуществлено за счет перепада давления и известно специалистам в данной области техники. Смешивание может быть вызвано барботированием инертного газа из нижней части реактора. Барботирование газа может быть прерывистым, так что жидкость попеременно продавливается через твердую подложку и псевдооживляется вместе с твердой

35 подложкой, или это может быть постоянное барботирование в течение всего времени

реакции. Прерывистое псевдооживление может быть более важным для высоких узких реакторов для быстрого достижения полного контакта жидкости со всей твердой подложкой и может быть менее важным для реакторов большего диаметра.

В примерах 1-4 и 6-10 промывочный растворитель сливают из нижней части реактора с фильтром перед загрузкой реагентов. Точно так же реакционные растворы сливают из нижней части реактора с фильтром перед загрузкой следующих промывочных растворителей. Это уменьшает обратное смешивание и делает процесс более эффективным по сравнению с реакторами с уплотненным слоем, в которых не осуществляют слив в промежутках между этапами цикла.

10

**Пример 1. Получение антисмысловой нити HPRT Div22 с использованием псевдооживления с восходящим потоком жидкости**

Антисмысловая нить HPRT Div22 имеет следующую последовательность: 5' [Phos]mA\*fU\* mA mA mA fA mU mC mU mA mC mA mG fU mC fA mU mA mG mG mA\*mA\*mU, где \* обозначает связь P=S, и все остальные амидиты имеют связь P=O и РНК1 {p.m(A)[sp].[fl2r](U)[sp].m(A)p.m(A)p.m(A)p.[fl2r](A)p.m(U)p.m(C)p.m(U)p.m(A)p.m(C)p.m(A)p.m(G)p.[fl2r](U)p.m(C)p.[fl2r](A)p.m(U)p.m(A)p.m(G)p.m(G)p.m(A)[sp].m(A)[sp].m(U)}\$\$\$\$V2.0. (Структура показана на Фигуре 6).

Синтез указанной молекулы с использованием способа с применением псевдооживленного слоя по настоящему изобретению описан в настоящем документе и включает стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и кэпирования для последовательного введения оставшихся фосфорамидитов в антисмысловую нить HPRT Div22 в направлении от 3' к 5'. Цели примера 1 заключались в том, чтобы впервые осуществить химический синтез в экспериментальном реакторе с псевдооживленным слоем с высокой чистотой и высоким выходом. Не преследовалась цель минимизации количества растворителя для промывки, в качестве которого использовали ACN, минимизации количества раствора реагента DCA, минимизации количества эквивалентов амидита или демонстрации большой высоты слоя твердой подложки. Примеры, обеспечивающие минимизацию использования растворителя ACN, представлены в примере 6, выполненном в экспериментальном масштабе, и в примерах 8 и 9, выполненных в полупромышленном масштабе. Пример, обеспечивающий минимизацию количества раствора DCA, представлен в примере 7. Кроме того, в примере 1 в каждом цикле использовали четыре эквивалента амидита. Напротив, в примерах 2-9 использовали два эквивалента амидита для всех или большинства циклов. Высота слоя твердой подложки для примера 1 составляла лишь не более 2 см, тогда как высота слоя твердой подложки для

примеров 2-4 и примеров 6-10 была больше. См. пример 2, где описана высота слоя смолы 30 см. Руководство по выполнению всех примеров представлено в таблице 31.

Начинали с mU, связанного известными способами со смолой NittoPhase HL 2' OMeU(bz) 300, партия № E05005, 299 мкмоль/г (далее упоминаемого как «mU-смола»), со ссылкой на фиг. 3, где показана установка аппарата синтезатора.

Получали растворы реагентов, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Растворы реагентов

Название раствора	Содержание	Сокращение на фиг. 3	Сокращение на фиг. 5
Деблокирование	3% об. дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле	кислота	Кислота
Активатор	0,5 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ACN	активатор	Актив. 5 гал
Окисление	0,05 М йода в смеси пиридин/вода (90/10 об./об.)	I <sub>2</sub> или йод	I <sub>2</sub>
Сульфирование	0,02 М гидрида ксантана в смеси ACN/пиридин (70/30 об./об.)	сульф., гидрид ксантана или ХН	Сульф.
Кэпирующий раствор А	1-Метилимидазол/ACN (20/80 об./об.)	КэпА	КэпА
Кэпирующий раствор В	Смесь 1:1 В1 и В2, где В1 = 40% об. уксусного ангидрида в ACN, и В2 = 60% об. 2,6-лутидина в ACN	КэпВ или Кэп В1+В2	КэпВ
ДЭА	20% диэтиламина в ACN (20/80 об./об.)	ДЭА	ДЭА
Фосфорилирование	0,1 М 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]этил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)фосфорамидит в ACN	(нет)	(нет)

10

Получали 0,1 М растворы амидита, представленные в Таблица 2е 2, следующим образом: взвешивали твердый амидит во флаконе и вставляли впитывающий вкладыш, затем добавляли ACN до достижения концентрации 0,1 М. Конечно, квалифицированный специалист может также взвесить твердые вещества, растворить их в ACN, а затем добавить сита для сушки.

15

Таблица 2. Растворы амидитов

Название раствора амидита	Используемый амидит	Сокращенное название фосфорамидита
2'-O-Me-A	DMT-2'-O-Me-A(bz) амидит	mA
2'-O-Me-C	DMT-2'-O-Me-C(Ac) амидит	mC
2'-O-Me-G	DMT-2'-O-Me-G(iBu) амидит	mG
2'-O-Me-U	DMT-2'-O-Me-U амидит	mU
2'-F-dA	DMT-2'-F-dA(Bz) амидит	fA
2'-F-dC	DMT-2'-F-dC(Ac) амидит	fC
2'-F-dG	DMT-2'-F-dG(iBu) амидит	fG
2'-F-dU	DMT-2'-F-dU амидит	fU

Установка синтезатора олигонуклеотидов с вибрирующим псевдооживленным слоем показана на фиг. 3. На фиг. 3 «ACN» относится к ацетонитрилу. Заполняли все насосы и линии подачи. Вставляли сухую набивку во флакон с ACN и во все шприцы. Для растворов амидитов (насосы 101-108 для подачи амидитов на фиг. 3), растворов для фосфорилирования (насос 109 для подачи амидита на фиг. 3) и активатора (насос 110 для подачи активатора) использовали шприцевые насосы, а для подачи всех других реагентов и растворителей использовали перистальтические насосы и емкости для подачи. Оснащали реактор диаметром 1 см и высотой 20 см фильтром и автоматическим запорным вентилем (вентиль 24 на фиг. 3) в нижней части реактора, а затем достаточным количеством трубок с внутренним диаметром 1,59 мм, направленных от реактора к одному или нескольким выпускным вентилям (вентили 9 и 10 на фиг. 3), для вмещения объема исходящей жидкости ~ 2,5 мл. В реактор загружали 0,1040 г mU-смолы. Начальная высота слоя сухой смолы составляла ~0,3-0,4 см. Для каждого фосфорамидита, добавленного в синтез, последовательно выполняли стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования, если в последовательности присутствует связь P=S) и кэпирования, как описано ниже.

На каждой стадии псевдооживление слоя смолы выполняли в два различных периода времени: первый раз, когда в реактор загружали смесь реагентов и подвергали смолу ее воздействию, и второй раз, когда в реактор загружали промывочный растворитель. Однако во время реакции сочетания псевдооживление продолжается лишь в течение 10-минутного времени сочетания. В этом примере как во время загрузки реагента, так и во время промывки растворителем в зону подачи добавляли смесь реагентов или промывочный

растворитель (или его часть) и обеспечивали давление азота, нагнетая жидкость в реактор. Как показано на фиг. 3, это было достигнуто посредством закрывания вентилей 9 и 10, открывания вентиля 24 и подачи азота под давлением через соответствующее впускное отверстие (вентили 41, 42, 43, 44 или 45). Это обеспечивало принудительное течение жидкости в реакторе через слой смолы в трубопровод между реактором и вентилями 9 и 10 по мере выравнивания градиента давления между верхней частью реактора и трубопроводом между дном реактора и вентилями 9 и 10. Затем давление в верхней части реактора сбрасывали посредством открывания соответствующего вентиляционного отверстия (вентили 51, 52, 53, 54 или 55), создавая градиент давления, который уравнивался с атмосферным давлением по мере восходящего течения жидкости из нижней части реактора, обеспечивая перемешивание и псевдооживление слоя смолы. Процесс нагнетания азота и выпуска воздуха повторяли указанное количество раз, каждый раз по меньшей мере в течение такого времени, которого достаточно для псевдооживления слоя смолы. Если для псевдооживления слоя использовали только часть смеси реагентов или промывочного растворителя, то оставшуюся смесь реагентов или промывочный растворитель пропускали через смолу в режиме поршневого потока, при котором вентиль 9 закрыт, вентиль 10 открыт, азот под давлением подают в верхнюю часть реактора и приводят в действие насос 9 для дозированного вывода жидкости из нижней части реактора по мере добавления жидкости (смеси реагентов или промывочного растворителя) в верхнюю часть реактора.

В представленном первом примере количество эквивалентов амидита+активатора, количество эквивалентов DCA и объемы промывочного растворителя были очень высокими по сравнению со всеми последующими примерами, поскольку это была предварительная демонстрация раннего прототипа. Читатель увидит, что по мере продвижения по примерам и вариантам осуществления предложенный процесс совершенствуется, а объем промывочного растворителя уменьшается. Обобщение вариантов реализации представлено в таблице 31.

**Деблокирование:** Повернуть вентиль 8 в положение А, вентиль 7 в положение В и закрыть вентиль 24. Загрузить 8 мл деблокирующего раствора (Таблица 1) в зону подачи, затем обеспечить его принудительное движение в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Открыть вентиль 24. Закрыть сливные вентили отходов (вентили 9 и 10 на фиг. 3). В реактор подавать азот под давлением в течение 5 секунд, в результате чего ~ 1,5 мл раствора реагента проходит через слой смолы и выходит из фильтра в нижней части реактора в технологическую трубку, сдавливая газовую полость в трубке. Сбросить давление в верхней части реактора в течение 5 секунд, вызывая обратный поток жидкого реагента обратно в нижнюю часть реактора для перемешивания и псевдооживления слоя

смолы. Повторить процесс псевдооживления (подачу азота под давлением в течение 5 секунд и сброс давления в течение 5 секунд). Открыть вентиль отходов (вентиль 10) и прокачать деблокирующий раствор через слой смолы с помощью насоса 9 со скоростью 16 мл за 330 секунд в течение 330 секунд. Параллельно с работой насоса 9 открыть вентиль 14 и включить насос 1 для подачи деблокирующего раствора со скоростью 10 мл/мин, пока не будет прокачено 8 мл (насос 1 заканчивает работу раньше насоса 9). Жидкость, перекачиваемая в зону подачи кислоты из насоса 1, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания потока в течение 330 секунд. Общее время контакта смолы с деблокирующим раствором перед следующей стадией промывки ACN составляет 6,9 мин. Закрывать вентиль 10 и один раз выполнить процедуру А промывки ACN, затем дважды выполнить процедуру В промывки ACN.

Процедура промывки А ACN: Открыть вентиль 9 отходов, загрузить ACN (4 мл) в зону подачи, затем закрыть вентиль 9 и обеспечить принудительное движение жидкости в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Выполнить псевдооживление слоя смолы пять раз, как описано выше, создавая давление в реакторе с помощью азота в течение 5 секунд и сбрасывая давление в течение 5 секунд. Открыть вентиль 9 отходов и обеспечить принудительное движение жидкости под давлением азота в течение 8 секунд.

Процедура промывки В ACN: Открыть вентиль 9 (отходов) и загрузить ACN (12 мл) в зону подачи, затем закрыть вентиль 9 и обеспечить принудительное движение жидкости в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Выполнить псевдооживление слоя смолы три раза, как описано выше, создавая давление в реакторе с помощью азота в течение 5 секунд и сбрасывая давление в течение 5 секунд. Открыть вентиль 10 и прокачать насосом 9 со скоростью 20 мл за 110 секунд в течение 110 секунд. Параллельно с работой насоса 9 открыть вентиль 34 и включить подачу насосом 2 со скоростью 40 мл/мин до тех пор, пока не будет перекачено 8 мл ACN (насос 2 заканчивает работу раньше насоса 9). Жидкость, закачиваемая в зону подачи из насоса 2, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания потока в течение 110 секунд. По окончании закрыть вентиль 10.

**Реакция сочетания:** После промывки после деблокирования связывали следующий по последовательности фосфорамидит, который вводили с использованием последовательных стадий в направлении от 3' к 5'. Для каждого фосфорамидита, присоединяемого в последовательности, реакцию сочетания осуществляли по существу таким образом, как описано ниже, используя раствор амидита (указанный в таблице 2), соответствующий фосфорамидиту в последовательности. Повернуть вентиль 8 в положение В. Дважды предварительно промыть зону подачи амидита и канал подачи в

реактор, каждый раз закачивая 4 мл ACN в зону подачи амидита при закрытом вентиле 9, затем открыть вентиль 9 и закачать азот под давлением в течение 8 секунд. Сначала в зону подачи закачать раствор активатора (1,2 мл, 20 экв., Таблица 1), а затем соответствующий раствор амидита из таблицы 2 (1,2 мл, 4,0 экв.). Закрыть вентили 9 и 24 и прокачать смесь из зоны подачи в реактор под давлением азота в течение 5 секунд, затем открыть вентиль 24 и продолжить подачу азота под давлением в течение 8 секунд.

С помощью растворов амидита и активатора, смешанных со смолой, выполнить повторное псевдооживление слоя при открытом вентиле 24 и закрытом вентиле 9 следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 5 секунд, затем сбросить давление в верхней части реактора в течение 5 секунд. Повторить описанный процесс несколько раз в течение 10 мин, затем открыть вентиль 9 и закачать азот под давлением в течение 8 секунд в верхнюю часть реактора, сливая жидкость со дна реактора в отходы. Закачать ACN (10 мл) в зону подачи амидита и прокачать его через реактор под давлением азота в течение 30 секунд, затем повторить описанную промывку ACN еще раз.

**Реакция окисления** (если требуется вместо сульфирования): после промывки реакции сочетания проводили реакцию окисления, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентили 6, 7 и 8 в положение А и открыть вентиль 9. Закачать окислительный раствор (Таблица 1, 4,5 мл) в зону подачи, закрыть вентиль 9 и прокачать раствор в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Дважды выполнить псевдооживление слоя в реакторе следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 5 секунд, затем сбросить давление азота, выпуская его в течение 5 секунд. Открыть вентиль 10 и откачать 4,5 мл объема жидкости насосом 9 в течение 40 секунд, затем закрыть вентиль 10. Открыть вентиль 9 и закачать ACN (4 мл) в зону подачи, затем закрыть вентиль 9 и прокачать ACN в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Выполнить псевдооживление слоя реактора пять раз следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 5 секунд, затем сбросить давление азота, выпуская его в течение 5 секунд. Открыть вентиль 9 и прокачать жидкость из реактора в отходы под давлением азота из верхней части реактора в течение 8 секунд.

После реакции окисления дважды выполнить следующую промывку ACN в режиме «поршневого потока». Открыть вентиль 9 и закачать ACN в зону подачи (8 мл). Закрыть вентиль 9 и прокачать жидкость в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Дважды выполнить псевдооживление слоя в реакторе следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 5 секунд, затем сбросить давление азота, выпуская его в течение 5 секунд. Открыть вентиль 10 и откачать 12 мл жидкости с

помощью насоса 9 в течение 95 секунд. Параллельно с работой насоса 9 открыть вентиль 33 и включить подачу насосом 2 со скоростью 30 мл/мин до тех пор, пока не будет перекачено 4 мл АСН (насос 2 заканчивает работу раньше насоса 9). Жидкость, закачиваемая в зону подачи из насоса 2, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания потока в течение 95 секунд. По окончании закрыть вентиль 10.

**Реакция сульфирования (тиолирования)** (если требуется вместо окисления): после промывки реакции сочетания проводили реакцию тиолирования, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентиль 6 в положение В, вентили 5, 7 и 8 в положение А и открыть вентиль 9. Закачать раствор для сульфирования (Таблица 1, 4,5 мл) в зону подачи, закрыть вентиль 9 и прокачать раствор в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Дважды выполнить псевдооживление слоя в реакторе следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 5 секунд, затем сбросить давление азота, выпуская его в течение 5 секунд. Открыть вентиль 9 и прокачать жидкость из реактора в отходы под давлением азота из верхней части реактора в течение 8 секунд. Дважды выполнить такую же промывку АСН в режиме «поршневого потока», как описано в процедуре реакции окисления, за исключением того, что промывка проходит через «зону подачи ХН» (фиг. 3).

**Реакция кэпирования:** после промывки реакции окисления (или сульфирования) проводили реакцию кэпирования, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентили 5 и 6 в положение В, а вентили 7 и 8 в положение А. Открыть вентиль 9. Одновременно закачать кэпирующий раствор А (Таблица 1, 2,1 мл) и кэпирующий раствор В (Таблица 1, 2,1 мл) в зону подачи и затем закрыть вентиль 9. Прокачать жидкость в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Дважды выполнить псевдооживление слоя в реакторе следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 5 секунд, затем сбросить давление азота, выпуская его в течение 5 секунд. Открыть вентиль 10 и откачать 4,2 мл объема жидкости в течение 100 секунд. Закрыть вентиль 10 и дважды выполнить такую же промывку АСН в режиме «поршневого потока», как описано в процедуре реакции окисления, за исключением того, что промывка проходит через «зону подачи кэпирующего раствора» (фиг. 3).

После завершения последнего фосфорамидитного цикла повторяли цикл, используя фосфорилирующий раствор (Таблица 1) вместо амидита. После сочетания и окисления фосфорилирующего реагента повторяли стадию деблокирования, а затем промывку растворителем. Промывали смолу раствором ДЭА (Таблица 1) в течение 10 минут. Промывали АСН и сушили, пропуская азот вниз через слой смолы, с получением 380 мг

сухой смолы. Исходная масса смолы составляла 104 мг. Это соответствует увеличению массы на 276 мг, что составляет 8,88 г/ммоль, таким образом, выход неочищенной массы защищенного олигонуклеотидного продукта составляет 96% по приросту массы.

5 Выполняли реакцию отщепления и снятия защиты с использованием концентрированного раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$  при 50 °С в течение 4 часов. По данным СВЭЖХ, отщепленный олигонуклеотидный продукт, лишенный защиты, имеет чистоту 82% по проценту площади пика, как показано в таблице результатов СВЭЖХ для примеров с 1 по 5 (таблица 13). Анализ ЖХМС подтверждает, что пик основного продукта представляет собой правильную антисмысловую нить HPRT div22.

10 Ссылаясь на фигуру 3 и рассматривая пример 1, подробная процедура автоматизации последовательности операций насосов и вентилях записывается следующим образом.

Ниже показан (и будет описан в отношении варианта реализации, представленного на фиг. 3, и с учетом примера 1) пример подробной процедуры автоматизации 15 последовательности операций насосов и вентилях.

Подробная процедура автоматизации последовательности операций насосов и вентилях для примера 1. Ключ: «О» означает «открыт»; «С» означает «закрыт»; «Р» означает «насос», например, «Р9» относится к «насосу 9» на фиг. 3.

20 Деблокирование

вентиль 8 в положение А,

вентиль 7 в положение В,

Закачать раствор кислоты в зону подачи кислоты

О 9

25 О 54

О 14

Закачать кислоту в зону подачи кислоты (8 мл)

С 14

С 54

30 С 9

Закачать раствор кислоты в реактор и дважды провести псевдооживление для достижения полного контакта жидкости с твердым веществом и повторного установления плоского слоя без каналов.

О 44

35 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 2 раза.

О 44

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 44

5 О 54

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

С 54

Прокачать раствор кислоты через смолу в режиме поршневого потока для протекания реакции.

10 О 44

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 16 мл за 330 секунд на следующие 330 секунд.

Параллельно с работой Р9 открыть 14 и включить подачу насосом Р1 со скоростью 10 мл/мин, пока не будет перекачено 8 мл. Р1 заканчивает работу раньше Р9.

15 Жидкость, закачиваемая в зону подачи кислоты из Р1, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания поршневого потока в течение 330 секунд.

С 14

С 44

20 С 10

Закачать АСН в зону подачи кислоты

О 9

О 34

О 54

25 Закачать «объем АСН для деблокирования промывки в псевдооживленном слое» (4 мл)

С 34

С 54

С 9

30 Промыть псевдооживленный слой небольшим количеством АСН после деблокирования

О 44

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Повторить следующие 6 строк 5 раз.

О 44

35 Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 44

О 54

Ожидать «время стравливания для псевдоожигения слоя» (5 секунд)

С 54

5 О 44

О 9

Ожидать «время для прокачивания в отходы после псевдоожигения» (8 секунд)

С 44

10 Промыть в режиме поршневого потока после деблокирования (2 раза). Промывку в режиме поршневого потока начинают с 3 псевдоожигений для обеспечения плоскостности слоя и устранения образования каналов.

О 9

О 34

О 54

15 Закачать АСН в зону подачи (12 мл)

С 34

С 54

С 9

О 44

20 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Повторить следующие 6 строк 3 раза.

О 44

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 44

25 О 54

Ожидать «время стравливания для псевдоожигения слоя» (5 секунд)

С 54

О 44

О 10

30 Включить насос Р9 со скоростью 20 мл за 110 секунд на следующие 110 секунд. Параллельно с работой Р9 открыть 34 и включить подачу насосом Р2 со скоростью 40 мл/мин, пока не будет перекачено 8 мл АСН. Р2 заканчивает работу раньше Р9. Жидкость, закачиваемая в зону подачи кислоты из Р2, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания поршневого потока в течение 110 секунд.

35

С 34

С 44

С 10

## 5 Реакция сочетания

Вентиль 8 в положение В

Предварительно промыть амидитную зону и канал подачи в реактор перед осуществлением сочетания (2 раза)

О 35

10 О 55

Насос Р2, закачать 4 мл АСН в зону подачи амидита.

С 35

С 55

О 9

15 О 45

Ожидать время до прокачивания в отходы (8 секунд)

С 45

Ввести отмеренное количество амидита и активатора в зону подачи амидита

20 Открыть вентиль 110А

Закачать указанный объем активатора (1,2 мл).

Закрыть вентиль 110А

Открыть вентиль 110В

Ожидать 5 секунд до закачивания раствора активатора в зону смешивания амидита

25 Закрыть вентиль 110В

Открыть вентиль 101А ПРИМЕЧАНИЕ: Вентиль 101 использовали для mA. Каждый из амидитов имел свои вентили и свою линию подачи в зону активации.

Закачать указанный объем амидита (1,2 мл).

Закрыть вентиль 101А

30 Открыть вентиль 101В

Ожидать 5 секунд до закачивания раствора амидита в зону смешивания амидита

Закрыть вентиль 101В

Закачать реакционный раствор амидита в реактор и смешивать со смолой в течение 10 минут.

35 С55

- С 9  
С 24  
О 45  
Ожидать 5 секунд
- 5 О 24  
Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)  
Повторить следующие 7 строк, «время сочетания в псевдоожигенном слое»  
(10 минут).  
О 45
- 10 Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)  
С 45  
О 55  
Ожидать «время стравливания для псевдоожигения слоя» (5 секунд)  
С 55
- 15 Ожидать «время между псевдоожигениями во время сочетания» (2 секунды)  
По истечении «времени сочетания в псевдоожигенном слое»  
О 45  
О 9  
Ожидать «время для прокачивания в отходы после псевдоожигения» (8 секунд)
- 20 С 45  
Промыть растворителем с АСН после сочетания (2 раза)  
О 35  
О 55  
Закачать «объем АСН для однопроводной промывки продукта сочетания» (10 мл)
- 25 С 35  
С 55  
О 9  
О 101В, 102В, 103В, 104В, 105В, 106В, 107В, 108В, 109В, 110В одновременно  
Ожидать «время до прокачивания в отходы после однопроводной промывки  
продукта сочетания» (30 секунд).
- 30 С 101В, 102В, 103В, 104В, 105В, 106В, 107В, 108В, 109В, 110В одновременно  
С 9  
Окисление (если требуется вместо сульфирования)  
О 9
- 35 Вентиль 8 в положение А

Вентиль 7 в положение А

Вентиль 6 в положение А

Закачать раствор йода в зону подачи окислителя

О 13

5 О 53

Закачать 4,5 мл йода

С 13

С 53

С 9

10 Закачать раствор йода в реактор и дважды выполнить псевдооживление, чтобы снова установился плоский слой без каналов

О 43

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 2 раза.

15 О 43

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 43

О 53

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

20 С 53

Прокачать раствор йода через смолу в режиме поршневого потока для протекания реакции

О 43

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 4,5 мл за 40 секунд на следующие 40 секунд.

25 С 43

С 10

Промыть псевдооживленный слой небольшим количеством АСN после окисления

О 9

О 33

30 О 53

Закачать 4 мл АСN в зону подачи окислителя

С 33

С 53

С 9

35 О 43

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 5 раз.

О 43

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

5 С 43

О 53

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

С 53

О 43

10 О 9

Ожидать «время для прокачивания в отходы после псевдооживления» (8 секунд)

С 43

Промыть после окисления в режиме поршневого потока (2 раза). Промывку в режиме поршневого потока начинают с 3 псевдооживлений для обеспечения плоскостности слоя и

15 устранения образования каналов.

О 9

О 33

О 53

Закачать ACN в зону подачи (8 мл)

20 С 33

С 53

С 9

О 43

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

25 Выполнить следующие 6 строк 3 раза.

О 43

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 43

О 53

30 Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

С 53

О 43

О 10

Включить насос P9 со скоростью 12 мл за 95 секунд на следующие 95 секунд.

Параллельно с работой Р9 открыть 33 и включить подачу насосом Р2 со скоростью 30 мл/мин, пока не будет перекачано 4 мл АСН. Р2 заканчивает работу раньше Р9. Жидкость, закачиваемая в зону подачи окислителя из Р2, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания поршневого потока в течение 95 секунд.

5

С 33

С 43

С 10

Сульфирование (если требуется вместо окисления)

10

О 9

Вентиль 8 в положение А

Вентиль 7 в положение А

Вентиль 6 в положение В

Вентиль 5 в положение А

15

Закачать сульфорирующий раствор в зону подачи сульфорирующего реагента

О 12

О 52

Закачать сульфорирующий раствор (4,5 мл)

С 12

20

С 52

С 9

Закачать сульфорирующий раствор в реактор и дважды выполнить псевдооживление, чтобы снова установился плоский слой без каналов.

О 42

25

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 2 раза.

О 42

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 42

30

О 52

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

С 52

Прокачать сульфорирующий раствор через смолу в режиме поршневого потока для протекания реакции.

35

О 42

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 4,5 мл за 90 секунд на следующие 90 секунд.

С 42

С 10

5 Промыть псевдооживленный слой небольшим количеством АСН после сульфирования

О 9

О 32

О 52

Закачать 4 мл АСН в зону подачи сульфорирующего реагента

10

С 32

С 52

С 9

О 42

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

15

Выполнить следующие 6 строк 5 раз.

О 42

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 42

О 52

20

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

С 52

О 42

О 9

Ожидать «время для прокачивания в отходы после псевдооживления» (8 секунд)

25

С 42

Промыть после сульфирования в режиме поршневого потока (2 раза). Промывку в режиме поршневого потока начинают с 2 псевдооживлений, чтобы сделать слой плоским и устранить образование каналов.

О 9

30

О 32

О 52

Закачать АСН в зону подачи (8 мл)

С 32

С 52

35

С 9

О 42

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 2 раза.

О 42

5 Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 42

О 52

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

С 52

10 О 42

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 12 мл за 95 секунд на следующие 95 секунд.

Параллельно с работой Р9 открыть 32 и начать подачу насосом Р2 со скоростью 30 мл/мин, пока не будет перекачено 4 мл АСН. Р2 заканчивает работу раньше Р9.

15 Жидкость, закачиваемая в зону подачи сульфорирующего реагента из Р2, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания поршневого потока в течение 95 секунд.

С 32

С 42

20 С 10

#### Кэпирование

Вентиль 8 в положение А

Вентиль 7 в положение А

Вентиль 6 в положение В

25 Вентиль 5 в положение В

Закачать кэпирующие растворы в зону подачи кэпирующих растворов

О 11А

О 11В

О 51

30 Одновременно закачать КэпА «объем КэпА» (2,1 мл) и закачать КэпВ «объем кэпВ» (2,1 мл).

С 11А

С 11В

С 51

35 С 9

Закачать кэпирующий раствор в реактор и дважды выполнить псевдооживление, чтобы снова установился плоский слой без каналов.

О 41

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

5 Выполнить следующие 6 строк 2 раза.

О 41

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 41

О 51

10 Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

С 51

Прокачать кэпирующий раствор через слой смолы в режиме поршневого потока для протекания реакции.

О 41

15 О 10

Включить насос Р9 со скоростью 4,2 мл за 100 секунд на следующие 100 секунд.

С 41

С 10

20 Промыть после кэпирования в режиме поршневого потока (2 раза). Промывку в режиме поршневого потока начинают с 2 псевдооживлений, чтобы сделать слой плоским и устранить образование каналов.

О 9

О 31

О 51

25 Закачать АСN в зону подачи кэпирующего раствора (8 мл)

С 31

С 51

С 9

О 41

30 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 2 раза.

О 41

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 41

35 О 51

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя» (5 секунд)

C 51

O 41

O 10

- 5 Включить насос P9 со скоростью 12 мл за 95 секунд на следующие 95 секунд.  
Параллельно с работой P9 открыть 31 и начать подачу насосом P2 со скоростью 30 мл/мин, пока не будет перекачено 4 мл ACN. P2 заканчивает работу раньше P9. Жидкость, закачиваемая в зону подачи кэпирующего раствора из P2, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и
- 10 поддержания поршневого потока в течение 95 секунд.

C 31

C 41

C 10

15 **Пример 2. Получение антисмысловой нити HPRT Div22 с высотой слоя смолы до 30**

**см**

- Получали ту же антисмысловую нить HPRT Div22, что и в примере 1. Синтез этой молекулы с использованием способа с псевдооживленным слоем по настоящему изобретению описан в настоящем документе и включает стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и кэпирования для последовательного введения оставшихся фосфорамидитов. Основные отличия заключаются в том, что геометрия реактора и способ псевдооживления изменены для обеспечения гораздо большей высоты слоя смолы. Процесс в данном примере осуществляли в масштабе 180 мкмоль, при этом высота слоя смолы, смоченной к концу эксперимента растворителем ACN, достигала 25 см.
- 20 Максимальная высота слоя смолы, равная 30 см, была достигнута во время нисходящего потока на последней стадии деблокирования. Максимальный перепад давления на слое смолы во время эксперимента составлял 20 фунтов/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.). Реактор имел нижнюю секцию с внутренним диаметром 0,63 см и высотой 32 см и верхнюю секцию с коническим дном диаметром 4,7 см и высотой 10,5 см. Реактор был оснащен сетчатым
- 25 фильтром из нержавеющей стали в нижней части секции диаметром 0,63 см.

- Каждый раз во время псевдооживления слоя смолы азот обеспечивал выдавливание жидкости и твердых веществ из секции с внутренним диаметром 0,63 см вверх, в верхнюю секцию с коническим дном, где пузырьки азота обеспечивали однородное смешивание и псевдооживление твердых веществ. Затем псевдооживленную суспензию продавливали
- 35 вниз, в секцию с внутренним диаметром 0,63 см, для повторного формирования слоя смолы

после каждого псевдооживления, в то время как небольшая часть жидкости выходила из нижней части реактора через сетчатый фильтр. Жидкость, поступающую из зон подачи, прокачивали в верхнюю часть секции с внутренним диаметром 4,7 см через трубку из нержавеющей стали диаметром 1/8 дюйма (3,2 мм), которая наклонена относительно стенки, а затем наклонена в радиальном направлении таким образом, что поступающая жидкость закручивается вокруг внутренней стенки для предотвращения ее разбрызгивания. Для реакций сочетания в примере 2 использовали 2 эквивалента амидита, а не 4 эквивалента, как в примере 1.

Начинали с mU, связанного известными способами со смолой NittoPhase HL 2' OMeU(bz) 250 (далее упоминаемого как «mU-смола»), со ссылкой на фиг. 3, где показана установка аппарата синтезатора. Использовали партию смолы G07010, загрузка 246 мкмоль/г. Начальная масса сухой смолы, помещенной в реактор, составляла 0,7322 г. Таким образом, масштаб эксперимента составлял 180,1 мкмоль.

Использовали растворы реагентов, описанные в таблице 3.

Таблица 3. Растворы реагентов для примера 2

Название раствора	Содержание	Партия	Поставщик
Основной растворитель	ACN	205244	Fisher
Деблокирование	3% об. дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле	DX727US	Honeywell
Активатор	0,5 М 5-(этилтио)-1H-тетразола в ACN	DW336US	Honeywell
Кэпирующий раствор А	1-Метилимидазол/ACN (20/80 об./об.)	DZ847	Honeywell
Кэпирующий раствор В	1:1 смесь В1 и В2		
Кэпирующий раствор В1	40% об. уксусного ангидрида в ACN	DX994US	Honeywell
Кэпирующий раствор В2	60% об. 2,6-лутидина в ACN	DY020US	Honeywell
ДЭА	20% диэтиламина в ACN (20/80 об./об.)		Honeywell
Окисление	0,05 М йода в смеси пиридин/вода (90/10 об./об.)	PY761	Honeywell
Сульфирование	0,2 М гидрида ксантана в смеси ACN/пиридин (70/30 об./об.)		
Фосфорилирование	0,1 М 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]этил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)фосфорамидит в ACN		Honeywell

Получали 0,1 М растворы амидитов, указанных ниже в таблице 4. Взвешивали твердый амидит во флаконе и вставляли впитывающий вкладыш, затем добавляли ACN до достижения концентрации 0,1 М.

Таблица 4. Состав растворов амидитов для примера 2.

5

Название раствора амидита	Используемый амидит	Поставщик	Партия	масса (г)	ACN (мл)
2'-O-Me-A	DMT-2'-O-Me-A(bz) амидит	ThermoFisher	VB2462	5,3786	60
2'-O-Me-C	DMT-2'-O-Me-C(Ac) амидит	ThermoFisher	VD1432	2,1442	25
2'-O-Me-G	DMT-2'-O-Me-G(iBu) амидит	ThermoFisher	VB2272	2,2338	25
2'-O-Me-U	DMT-2'-O-Me-U амидит	ThermoFisher	VB2282	1,9664	25
2'-F-Da	DMT-2'-F-dA(Bz) амидит	ThermoFisher	VB2242	2,2836	25
2'-F-dU	DMT-2'-F-dU амидит	ThermoFisher	VB2262	1,933	25
Phos		Hongene	LPR22B1A1	Не применимо	Не применимо

Заполняли все насосы и линии подачи. Вставляли сухую набивку во флакон с ACN и во все шприцы. Для амидитов и активатора использовали шприцевые насосы, а для подачи всех других реагентов и растворителей использовали перистальтические насосы и емкости для подачи. Для реагента Phos использовали один из шприцевых насосов для амидита (насос 9 для амидита). Оснащали фильтром вышеописанный реактор с внутренним диаметром 0,63 см. Устанавливали реактор поверх автоматического запорного вентиля (вентиль 24 на фиг. 3) в нижней части, а затем достаточное количество трубок от реактора к одному или нескольким выпускным вентилям (вентили 9 и 10 на фиг. 3) для вмещения объема исходящей жидкости ~ 3–4 мл.

15

Общие условия синтеза приведены в таблице 5.

Таблица 5. Условия синтеза в примере 2

Элемент	Значение	Единицы
Загрузка смолы	246	мкмоль/грамм
Исходное количество смолы	0,7322	грамм
Масштаб синтеза	180,1	мкмоль
Деблокирующий раствор, количество на один цикл	70 мл для циклов с 1 по 12, 87 мл для циклов с 13 по 24	мл
Концентрация амидита	0,1	М в ACN
Количество эквивалентов амидита	2	экв.
Раствор амидита, количество на один цикл	3,6	мл
Концентрация активатора	0,5	М в ACN
Количество эквивалентов активатора	10	экв.
Раствор активатора, количество на один цикл	3,6	мл
Количество эквивалентов окислителя	2,2 экв. для циклов 3 и 4, 2,5 экв. для циклов 5-20, 23	экв.
Время окисления	6	мин
Количество эквивалентов сульфорирующего реагента	13	экв.
Время сульфирования	8	мин
Кэпирующий раствор А, количество на один цикл	6,3	мл
Кэпирующий раствор В, количество на один цикл	6,3	мл
Время кэпирования	4	мин

5 Для каждого фосфорамидита, добавленного в синтез, последовательно выполняли стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования, если в последовательности присутствует связь P=S) и кэпирования, как описано ниже.

Ссылаясь на фигуру 3 и рассматривая пример 2, подробная процедура автоматизации последовательности операций насосов и вентилях записывается следующим образом. Если в процедуре указано, что жидкость прокачивают вниз через слой смолы, это

означает, что сливной насос на выходе из нижней части реактора работает с установленным заданным значением, в то время как давление азота давит на верхнюю часть слоя смолы, продавливая жидкость вниз. Перистальтический насос (насос 9) предназначен для измерения расхода жидкости через слой с регулируемой скоростью.

5            **Деблокирование:** Повернуть вентиль 8 в положение А, вентиль 7 в положение В и закрыть вентиль 24. Загрузить 30 мл деблокирующего раствора (3% об. дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле) в зону подачи, затем закачать его в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Открыть вентиль 24. Закрыть сливные вентили отходов (вентили 9 и 10 на фиг. 3). Повышать давление азота в реакторе в течение 3 секунд. Сбросить давление в  
10 верхней части реактора в течение 10 секунд, одновременно открывая вентиль 38, вызывая барботаж азота, обеспечивающий перемешивание и псевдооживление слоя смолы с растворами реагентов. Дозирующий вентиль, установленный последовательно с вентилем 38, отрегулировать таким образом, чтобы его высота была достаточной для того, чтобы твердые частицы и жидкость поднимались в верхнюю зону и смешивались друг с другом,  
15 но не слишком большой, чтобы твердые частицы не разбрызгивались на верхнюю часть верхней секции и чтобы минимизировать количество удаляемого растворителя. Повторить процесс псевдооживления еще 4 раза. Большая часть набухания смолы происходит во время псевдооживления. Открыть вентиль отходов (вентиль 10) и прокачать деблокирующий раствор через слой смолы с помощью насоса 9 со скоростью 12 мл/мин в течение времени,  
20 установленного пользователем (330 секунд для циклов 7-12, 410 секунд для циклов 13-24). Общее время контакта с деблокирующим раствором составляет: циклы 1 и 2 – 14 мин; цикл 3 – 12 мин; циклы 4 и 5 – 9 мин; цикл 6 – 7 мин; циклы 7-24 – 5,5 мин. Параллельно с работой насоса 9 открыть вентиль 14 и включить насос 1 для подачи деблокирующего раствора со скоростью 15 мл/мин, пока не будет перекачан объем, определенный пользователем (40 мл  
25 для циклов 1-12, 57 мл для циклов 13-24). Насос 1 заканчивает работу раньше насоса 9. Жидкость, закачиваемая в зону подачи кислоты из насоса 1, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания потока в течение установленного времени. Дважды провести процедуру промывки А АСN, используя 10 мл растворителя и осуществляя псевдооживление каждой промывки 4 раза,  
30 затем один раз провести процедуру промывки В АСN, используя 10 мл растворителя, затем один раз провести процедуру промывки А АСN, используя 40 мл растворителя и осуществляя псевдооживление каждой промывки 2 раза, затем один раз провести процедуру промывки В АСN, используя 10 мл растворителя. Весь промывочный растворитель подают в реактор через зону подачи кислоты (фиг. 3). Большая часть усадки смолы происходит во  
35 время первых 2 промывок в псевдооживленном слое, что снижает проблемы с перепадом

давления в высоком слое. Для первых 6 фосфорамидитов скорость потока деблокирующего раствора меньше, а общее время контакта больше, что обусловлено сопротивлением потоку и тем фактом, что давление в верхней части слоя реактора специально ограничено до 20 фунт/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.). Поток жидкости постепенно увеличивается, а общее время контакта с деблокирующим раствором постепенно уменьшается для оснований с 1 по 7.

Процедура промывки А АСN (промывка в псевдооживленном слое): Открыть вентиль 9 отходов, загрузить АСN в зону подачи кислоты, затем закрыть вентиль 9 и обеспечить принудительное движение жидкости в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Выполнить псевдооживление слоя смолы требуемое количество раз, как описано выше, повышая давление азота в реакторе в течение 3 секунд и сбрасывая давление и пропуская азот через реактор в течение 10 секунд. Открыть вентиль 10 и включить насос 9 отходов для перекачивания отходов со скоростью 30 мл/мин в течение 20 секунд.

Процедура промывки В АСN (промывка в режиме поршневого потока, без псевдооживления): Открыть вентиль 9 (отходов) и загрузить АСN в зону подачи кислоты, затем закрыть вентиль 9 и обеспечить принудительное движение жидкости в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Открыть вентиль 10 и прокачать насосом 9 со скоростью 30 мл/мин в течение 20 секунд.

**Реакция сочетания:** После промывки после деблокирования связывали следующий по последовательности фосфорамидит, который вводили с использованием последовательных стадий в направлении от 3' к 5'. Для каждого фосфорамидита, присоединяемого в последовательности, реакцию сочетания осуществляли по существу таким образом, как описано ниже, используя раствор амидита (указанный в таблице 4), соответствующий фосфорамидиту в последовательности. Повернуть вентиль 8 в положение В. Дважды предварительно промыть зону подачи амидита и канал подачи в реактор, каждый раз закачивая 8 мл АСN в зону подачи амидита при закрытом вентиле 9, затем открыть вентиль 9 и закачать азот под давлением в течение 30 секунд. Сначала в зону подачи закачать раствор активатора (3,6 мл, 10 экв.), а затем соответствующий раствор амидита из таблицы 4 (3,6 мл, 2,0 экв.). Закрыть вентили 9 и 24 и прокачать смесь из зоны подачи в реактор под давлением азота в течение 5 секунд.

С помощью растворов амидита и активатора, смешанных со смолой, выполнить повторное псевдооживление слоя при открытом вентиле 24 и закрытом вентиле 9 следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 3 секунд, затем сбросить давление в верхней части реактора и открыть вентиль 38 для пропускания азота через реактор в течение 6 секунд. Обеспечить возможность каскадного

осыпания смолы через жидкость в течение 8 секунд. Повторить процесс несколько раз в течение 10 мин, затем открыть вентиль 9 и закачать азот под давлением в течение 30 секунд в верхнюю часть реактора, сливая жидкость со дна реактора в отходы. Закачать ACN (10 мл) в зону подачи и прокачать его через реактор под давлением азота в течение 30 секунд, затем повторить описанную промывку ACN еще раз.

**Реакция окисления** (если требуется вместо сульфирования): после промывки реакции сочетания проводили реакцию окисления, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентили 6, 7 и 8 в положение А и открыть вентиль 9. Закачать окислительный раствор (9 мл, 2,5 эквивалента) в зону подачи, закрыть вентиль 9 и прокачать раствор в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Выполнить псевдооживление слоя реактора пять раз следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 3 секунд, затем сбросить давление азота, выпуская его, и открыть вентиль 38 для пропускания азота через реактор в течение 10 секунд. Открыть вентиль 10 и откачать 9 мл жидкости с помощью насоса 9 в течение 60 секунд. Дважды выполнить процедуру промывки А ACN (промывка в псевдооживленном слое), используя 10 мл растворителя, осуществляя псевдооживление первой промывки 4 раза и второй промывки – 2 раза. Затем один раз выполнить процедуру промывки В ACN (промывка в режиме поршневого потока), используя 10 мл растворителя, затем один раз выполнить процедуру промывки А ACN, используя 30 мл растворителя и осуществляя псевдооживление 3 раза, затем один раз выполнить процедуру промывки В ACN, используя 10 мл растворителя. Весь промывочный растворитель подают в реактор через зону подачи окислителя. Большая часть усадки смолы происходит во время первых 2 промывок в псевдооживленном слое, что снижает проблемы с перепадом давления в высоком слое.

**Реакция сульфирования (тиолирования)** (если требуется вместо окисления): после промывки реакции сочетания проводили реакцию тиолирования, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентиль 6 в положение В, вентили 5, 7 и 8 в положение А и открыть вентиль 9. Закачать раствор для сульфирования (12 мл) в зону подачи, закрыть вентиль 9 и прокачать раствор в реактор под давлением азота в течение 8 секунд. Выполнить псевдооживление слоя реактора 22 раза следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 3 секунд, затем сбросить давление азота, выпуская его, и открыть вентиль 38 для пропускания азота через реактор в течение 10 секунд. Большая часть набухания смолы происходит во время псевдооживления. Общее время для 22 псевдооживлений составляет примерно 8 минут. Открыть вентиль отходов (вентиль 10) и прокачать сульфидующий раствор через слой смолы с помощью насоса 9 со скоростью 12 мл за 30 секунд. Дважды выполнить процедуру промывки А ACN (промывка

в псевдооживленном слое), используя 10 мл растворителя, осуществляя псевдооживление первой промывки 4 раза и второй промывки – 2 раза. Затем один раз выполнить процедуру промывки В АСН (промывка в режиме поршневого потока), используя 10 мл растворителя, затем один раз выполнить процедуру промывки А АСН, используя 30 мл растворителя и

5 осуществляя псевдооживление 3 раза, затем один раз выполнить процедуру промывки В АСН, используя 10 мл растворителя. Весь промывочный растворитель подают в реактор через зону подачи ХН (фиг. 3). Большая часть усадки смолы происходит во время первых 2 промывок в псевдооживленном слое, что снижает проблемы с перепадом давления в высоком слое.

10 **Реакция кэпирования:** после промывки реакции окисления (или сульфирования) проводили реакцию кэпирования, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентили 5 и 6 в положение В, а вентили 7 и 8 в положение А. Открыть вентиль 9. Одновременно закачать кэпирующий раствор А (6,3 мл) и кэпирующий раствор В (6,3 мл) в зону подачи и затем закрыть вентиль 9. Прокачать жидкость в реактор под давлением азота в течение 8

15 секунд. Выполнить псевдооживление слоя реактора 3 раза следующим образом: закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 3 секунд, затем сбросить давление азота, выпуская его, и открыть вентиль 38 для пропускания азота через реактор в течение 10 секунд. Большая часть набухания смолы происходит во время псевдооживления. Открыть вентиль 10 и откачать 12,6 мл объема жидкости в течение 70 секунд. Дважды выполнить

20 процедуру промывки А АСН (промывка в псевдооживленном слое), используя 10 мл растворителя, осуществляя псевдооживление первой промывки 3 раза и второй промывки – 2 раза. Затем один раз выполнить процедуру промывки В АСН (промывка в режиме поршневого потока), используя 10 мл растворителя, затем один раз выполнить процедуру промывки А АСН, используя 30 мл растворителя и осуществляя псевдооживление 3 раза,

25 затем один раз выполнить процедуру промывки В АСН, используя 10 мл растворителя. Весь промывочный растворитель подают в реактор через зону подачи кэпирующего раствора (фиг. 3). Большая часть усадки смолы происходит во время первых 2 промывок в псевдооживленном слое, что снижает проблемы с перепадом давления в высоком слое.

После завершения последнего цикла связывания амидита повторяли цикл, используя

30 фосфорилирующий раствор вместо амидита. После сочетания и окисления фосфорилирующего реагента повторяли стадию деблокирования. Промывали смолу раствором ДЭА следующим образом. Загрузить в реактор 9,3 мл раствора ДЭА, выполнить псевдооживление 4 раза, затем откачать из нижней части реактора со скоростью 8 мл/мин. Повторить промывку с использованием 9,3 мл ДЭА еще 3 раза. Затем промывали с

35 использованием АСН, как описано ниже. Дважды выполнить процедуру промывки А АСН

(промывка в псевдооживленном слое), используя 10 мл растворителя, осуществляя псевдооживление первой промывки 4 раза и второй промывки – 2 раза. Затем один раз выполнить процедуру промывки В АСН (промывка в режиме поршневого потока), используя 10 мл растворителя, затем один раз выполнить процедуру промывки А АСН, используя 30 мл растворителя и осуществляя псевдооживление 2 раза, затем один раз выполнить процедуру промывки В АСН, используя 10 мл растворителя.

Сушили азотом, пропуская его вниз через слой смолы, с получением 2,2319 г сухой смолы. Это соответствует увеличению массы на 1,4997 г. Это соответствует увеличению массы на 8,83 г/ммоль, таким образом, выход неочищенной массы защищенного олигонуклеотидного продукта составляет 96% по приросту массы.

Выполняли реакцию отщепления и снятия защиты в небольшом образце с использованием концентрированного раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$  при 50 °С в течение 4 часов. По данным СВЭЖХ, отщепленный олигонуклеотидный продукт, лишенный защиты, имеет чистоту 80,85% по проценту площади пика, как показано в таблице результатов СВЭЖХ для примеров с 1 по 5 (таблица 13). Анализ ЖХМС подтверждает, что пик основного продукта представляет собой правильную антисмысловую нить HPRT div22.

Данные о набухании, усадке и росте слоя смолы для 23-мерной олигонуклеотидной конструкции представлены на фиг. 4. Максимальный перепад давления на слое смолы во время эксперимента составлял 20 фунтов/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.), поскольку это было давление подачи азота, используемого для продавливания жидкости через слой смолы.

Тренд, обозначенный как «детрит» на фиг. 4, представляет собой высоту слоя смолы после полного прохождения деблокирующего реакционного раствора вниз через слой смолы и его сливания, до промывки. Тренд, обозначенный как «АСН\_детрит» на фиг. 4, представляет собой высоту слоя после последней промывки растворителем АСН после деблокирования. Аналогичным образом, тренд, обозначенный как «сульф./ок.», представляет собой высоту слоя смолы после полного прохождения сульфидирующего или окислительного реакционного раствора вниз через слой смолы и его сливания, до промывки, и т.д. Высота слоя смолы увеличивалась примерно линейно от амидитного цикла 1 до цикла 24. Высота слоя смолы изменялась примерно на 5 см от минимального до максимального значения в каждом цикле. Например, гранулы смолы набухают во время реакции деблокирования, что приводит к увеличению высоты упакованного слоя смолы примерно на 4 см. Затем происходит усадка гранул смолы во время промывки, что приводит к уменьшению высоты слоя смолы примерно на 5 см. После реакции сочетания гранулы смолы набухают, и высота слоя увеличивается примерно на 4 см во время реакции окисления или сульфирования. Затем гранулы смолы подвергаются усадке во время

следующей промывки, что приводит к снижению высоты слоя смолы примерно на 4 см, и т.д. Учитывая описанные экстремальные явления набухания и усадки, происходящие 3 раза в каждом цикле на протяжении 24 циклов, было бы невозможно работать с такой высотой слоя в реакторе с уплотненным слоем только с нисходящим потоком, поскольку падение давления было бы слишком большим. Причина уменьшения перепада давления в реакторе с псевдооживленным слоем заключается в том, что набухание и усадка частиц смолы происходит, в основном, пока слой является псевдооживленным. Затем, когда слой смолы повторно оседает на каждой новой высоте слоя, сопротивление потоку через слой сохраняется на низком уровне, с максимальным перепадом давления лишь 20 фунтов/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.). Кроме того, каждый раз, когда слой смолы повторно оседает после каждой замены растворителя, не происходит образование каналов.

Ссылаясь на фигуру 3 и рассматривая пример 2, подробная процедура автоматизации последовательности операций насосов и вентилях записывается следующим образом.

Процедура аналогична той, которая описана для примера 1, но псевдооживление осуществляют посредством пропускания пузырьков азота через реактор снизу вверх. Кроме того, промывки после каждой реакции проводили по-разному. Первые 2 промывки были псевдооживленными, поскольку это способствует дальнейшему потоку жидкости для большой высоты слоя смолы. Большая часть набухания под действием реагента происходит при псевдооживлении в начале реакций, а большая часть усадки смолы происходит при псевдооживлении растворителем в начале промывок.

Повторяли описанную последовательность для каждого амидита. В описанной процедуре скорости и время закачивания во время деблокирования представляют собой циклы с 7 по 12. Время прокачивания для циклов с 13 по 24 составляло 410 секунд, а не 330 секунд, что обусловлено использованием большего количества деблокирующего раствора после первых 12 циклов. Скорость прокачивания во время деблокирования вначале была ниже, поскольку сопротивление потоку через слой смолы для первых шести циклов было больше. Скорость деблокирующего потока для первых 6 циклов постепенно увеличивалась, а время постепенно уменьшалось. Например, время реакции деблокирования в поршневом потоке составляло 840 секунд, и скорость прокачивания была установлена на уровне 5 мл/мин для первых 2 циклов, но к 7 циклу время реакции деблокирования в поршневом потоке составляло 330 секунд, и скорость прокачивания была установлена на уровне 12 мл/мин, поскольку сопротивление потоку через слой уменьшалось по мере увеличения длины олигомера на смоле.

## Деблокирование

вентиль 8 в положение А,

вентиль 7 в положение В,

Закачать раствор кислоты в зону подачи кислоты.

5 О 9 (это приводит к сбросу давления в реакторе в слое смолы и обеспечивает выход жидкости из нижней части реактора во время дозирования кислоты)

О 54

О 14

Закачать кислоту в зону подачи кислоты (30 мл)

10 С 14

С 54

С 9

Закачать раствор кислоты в реактор и 3 раза выполнить псевдооживление для протекания реакции и повторного осаждения плоского слоя без каналов.

15 О 44

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 3 раза.

О 44

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

20 С 44

О 54, О 38

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)

С 54, С 38

25 Прокачать раствор кислоты через смолу в режиме поршневого потока для протекания реакции.

О 44

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 12 мл/мин на 330 секунд.

30 Параллельно с работой Р9 открыть 14 и включить подачу кислоты со скоростью 15 мл/мин, пока не будет перекачено 40 мл. Жидкость, закачиваемая в зону подачи кислоты, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания поршневого потока в течение 330 секунд.

С 14

35 С 44

C 10

O 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (падение с ~20 фунт/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.) до 10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Промывка в псевдоожигенном слое. Проводить 2 раза, но первый раз выполнять псевдоожигение 4 раза, а второй раз – 2 раза.

O 9

O 34

O 54

Закачать ACN в зону подачи (10 мл)

10 C 34

C 54

C 9

O 44

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

15 Следующие 6 строк повторить 4 раза при первой промывке и 2 раза при второй промывке.

O 44

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

C 44

20 O 54, O 38

Ожидать «время стравливания для псевдоожигения слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)

C 54, C 58

O 44

25 O 10

Включить насос P9 со скоростью 20 мл/мин на 30 секунд.

C 44

C 10

30 O 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (падение с ~20 фунт/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.) до 10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Промывка в режиме поршневого потока.

O 9

O 34

O 54

35 Закачать ACN в зону подачи (10 мл)

- С 34  
С 54  
С 9  
О 44
- 5 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)  
О 10  
Включить насос Р9 со скоростью 30 мл/мин на 20 секунд.  
С 44  
С 10
- 10 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения.  
Промывка в псевдооживленном слое в большем масштабе для промывки верхних стенок реактора (следует отметить, что позже это было сочтено необязательным).  
О 9  
О 34
- 15 О 54  
Закачать АСН в зону подачи (40 мл)  
С 34  
С 54  
С 9
- 20 О 44  
Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)  
Выполнить следующие 6 строк 3 раза.  
О 44  
Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)
- 25 С 44  
О 54, О 38  
Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)  
С 54, С 58
- 30 О 44  
О 10  
Включить насос Р9 со скоростью 30 мл/мин на 80 секунд.  
С 44  
С 10

О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (падение с ~20 фунт/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.) до 10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Промывка в режиме поршневого потока.

- О 9
- 5 О 34
- О 54
- Закачать ACN в зону подачи (10 мл)
- С 34
- С 54
- 10 С 9
- О 44
- Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)
- О 10
- Включить насос Р9 со скоростью 30 мл/мин на 20 секунд.
- 15 С 44
- С 10
- О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (падение с ~20 фунт/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.) до 10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).
- Реакция сочетания
- 20 Вентиль 8 в положение В
- Предварительно промыть амидитную зону и канал подачи в реактор перед осуществлением сочетания (2 раза)
- О 35
- О 55
- 25 Насос Р2, закачать 8 мл ACN в зону амидита.
- С 35
- С 55
- О 9
- О 45
- 30 Ожидать некоторое время для продавливания через слой смолы в реакторе и выхода в отходы (30 секунд).
- С 45
- Ввести отмеренное количество амидита и активатора в зону подачи амидита + активатора.
- 35 Открыть вентиль 110А

- Закачать указанный объем активатора (3,6 мл).
- Заккрыть вентиль 110А
- Открыть вентиль 110В
- 5 Ожидать 5 секунд до закачивания раствора активатора в зону подачи амидита + активатора
- Заккрыть вентиль 110В
- Открыть вентиль 101А ПРИМЕЧАНИЕ: Вентиль 101 использовали для mА. Каждый из амидитов имел свои вентили и свою линию подачи в зону активации (фиг. 3).
- Закачать указанный объем амидита (3,6 мл).
- 10 Заккрыть вентиль 101А
- Открыть вентиль 101В
- Ожидать 5 секунд до закачивания раствора амидита в зону подачи амидита + активатора
- Заккрыть вентиль 101В
- 15 Закачать реакционный раствор амидита в реактор и смешивать со смолой в течение 10 минут.
- С55
- С 9
- С 24
- 20 О 45
- Ожидать 5 секунд
- О 24
- Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)
- Повторить следующие 7 строк, «время сочетания в псевдоожигенном слое»
- 25 (10 минут).
- О 45
- Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (3 секунды)
- С 45
- О 55, О 38
- 30 Ожидать «время стравливания для псевдоожигения слоя посредством барботирования N2» (6 секунд)
- С 55
- Ожидать «время между псевдоожигениями во время сочетания» (8 секунд)
- По истечении «времени сочетания в псевдоожигенном слое»
- 35 О 45

О 9

Ожидать «время для прокачивания в отходы после псевдоожигения» (30 секунд)

С 45

- 5 Ожидать, пока давление в реакторе не снизится до заданного пользователем значения, указывающего на то, что весь раствор для реакции сочетания прокачан в отходы (10 фунтов/кв.дюйм изб. (68,9 кПа)).

Промыть растворителем с АСН после сочетания (2 раза)

О 35

О 55

- 10 Закачать «объем АСН для однопроводной промывки продукта сочетания» (10 мл)

С 35

С 55

О 9

О 101В, 102В, 103В, 104В, 105В, 106В, 107В, 108В, 109В, 110В одновременно

- 15 Ожидать «время до прокачивания в отходы после однопроводной промывки продукта сочетания» (30 секунд).

О 101В, 102В, 103В, 104В, 105В, 106В, 107В, 108В, 109В, 110В одновременно

С 9

- 20 Окисление (если требуется вместо сульфирования)

О 9

Вентиль 8 в положение А

Вентиль 7 в положение А

Вентиль 6 в положение А

- 25 Закачать раствор йода в зону подачи окислителя.

О 13

О 53

Закачать 9 мл исходного раствора йода

С 13

- 30 С 53

С 9

Прокачать раствор йода в реактор и 11 раз выполнить псевдоожигение, что занимает примерно 4 минуты. Эту часть реакции проводят в периодическом режиме.

О 43

- 35 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 11 раз.

О 43

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (3 секунды)

С 43

- 5 О 53, О 38
- Ожидать «время стравливания для псевдоожигения слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)
- С 53, С 38

- 10 Прокатать раствор йода через смолу для протекания части реакции в режиме поршневого потока.

О 43

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 9 мл/мин на 60 секунд.

С 43

- 15 С 10
- О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (с 20 до 10 фунт/кв.дюйм изб. (с 137,9 кПа изб. до 68,9 кПа изб.)).

Промывка в псевдоожигенном слое. Проводить 2 раза, но первый раз выполнять псевдоожигение 4 раза, а второй раз – 2 раза.

- 20 О 9

О 33

О 53

Закачать АСН в зону подачи I2 (10 мл)

С 33

- 25 С 53

С 9

О 43

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

- 30 Следующие 6 строк повторить 4 раза при первой промывке в псевдоожигенном слое и 2 раза при второй промывке в псевдоожигенном слое.

О 43

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 43

- 35 О 53, О 38

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)

С 53, С 58

О 43

5 О 10

Включить насос Р9 со скоростью 20 мл/мин на 30 секунд.

С 43

С 10

10 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (с 20 фунт/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.) до 10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Промывка в режиме поршневого потока.

О 9

О 33

О 53

15 Закачать АСN в зону подачи I2 (10 мл)

С 33

С 53

С 9

О 43

20 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 30 мл/мин на 20 секунд.

С 43

С 10

25 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (с 20 фунт/кв.дюйм изб. (137,9 кПа изб.) до 10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Промывка в псевдооживленном слое в большем масштабе для промывки верхних стенок реактора (следует отметить, что позже это было сочтено необязательным).

О 9

30 О 33

О 53

Закачать АСN в зону подачи I2 (30 мл)

С 33

С 53

35 С 9

О 43

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 3 раза.

О 43

5 Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 43

О 53, О 38

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)

10 С 53, С 58

О 43

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 30 мл/мин на 60 секунд.

С 43

15 С 10

О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (с 20 до 10 фунт/кв.дюйм изб. (с 137,9 кПа изб. до 68,9 кПа изб.)).

Промывка в режиме поршневого потока.

О 9

20 О 33

О 53

Закачать ACN в зону подачи I2 (10 мл)

С 33

С 53

25 С 9

О 43

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 30 мл/мин на 20 секунд.

30 С 43

С 10

О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения (10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Сульфирование (если требуется вместо окисления)

О 9

Вентиль 8 в положение А

Вентиль 7 в положение А

5 Вентиль 6 в положение В

Вентиль 5 в положение А

Закачать сульфлирующий раствор в зону подачи ХН.

О 12

О 52

10 Закачать сульфлирующий раствор (12 мл)

С 12

С 52

С 9

Прокачать сульфлирующий раствор в реактор и 22 раза выполнить псевдооживление.

15 О 42

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 22 раза. Это занимает примерно 8 минут.

О 42

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (3 секунды)

20 С 42

О 52, О 38

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)

С 52, С 38

25 Прокачать сульфлирующий раствор через смолу для протекания части реакции в режиме поршневого потока.

О 42

О 10

Включить насос Р9 со скоростью, обеспечивающей опорожнение реактора примерно за 30 секунд.

30 С 42

С 10

О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем давления (с 20 до 10 фунт/кв.дюйм изб. (с 137,9 кПа изб. до 68,9 кПа изб.)).

Промывка в псевдоожигенном слое. Проводить 2 раза, но первый раз выполнять псевдоожигение 4 раза, а второй раз – 2 раза.

- О 9  
 О 32  
 5 О 52  
 Закачать АСN в зону подачи ХН (10 мл)  
 С 32  
 С 52  
 С 9  
 10 О 42  
 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)  
 Следующие 6 строк повторить 4 раза для первой промывки в псевдоожигенном слое и 2 раза для второй промывки в псевдоожигенном слое.  
 15 О 42  
 Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)  
 С 42  
 О 52, О 38  
 Ожидать «время стравливания для псевдоожигения слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)  
 20 С 52, С 58  
 О 42  
 О 10  
 Включить насос Р9 со скоростью 30 мл/мин на 20 секунд.  
 25 С 42  
 С 10  
 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения (10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).  
 Промывка в режиме поршневого потока.  
 30 О 9  
 О 32  
 О 52  
 Закачать АСN в зону подачи ХН (10 мл)  
 С 32  
 35 С 52

- С 9  
 О 42  
 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)  
 О 10
- 5 Включить насос Р9 со скоростью 40 мл/мин на 15 секунд.  
 С 42  
 С 10  
 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения (10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).
- 10 Промывка в псевдооживленном слое в большем масштабе для промывки верхних стенок реактора (следует отметить, что позже это было сочтено необязательным).  
 О 9  
 О 32  
 О 52
- 15 Закачать АСN в зону подачи (30 мл)  
 С 32  
 С 52  
 С 9  
 О 42
- 20 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)  
 Выполнить следующие 6 строк 3 раза.  
 О 42  
 Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)  
 С 42
- 25 О 52, О 38  
 Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)  
 С 52, С 58  
 О 42
- 30 О 10  
 Включить насос Р9 со скоростью 40 мл/мин на 45 секунд.  
 С 42  
 С 10  
 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения.
- 35 Промывка в режиме поршневого потока.

- О 9  
 О 32  
 О 52  
 Закачать АСН в зону подачи ХН (10 мл)
- 5 С 32  
 С 52  
 С 9  
 О 42  
 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)
- 10 О 10  
 Включить насос Р9 со скоростью 40 мл/мин на 14 секунд.  
 С 42  
 С 10  
 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения (10
- 15 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

#### Кэпирование

- Вентиль 8 в положение А  
 Вентиль 7 в положение А
- 20 Вентиль 6 в положение В  
 Вентиль 5 в положение В
- Закачать кэпирующие растворы в зону подачи кэпирующих растворов.
- О 11А  
 О 11В
- 25 О 51  
 Одновременно закачать КэпА «объем КэпА» (6,3 мл) и закачать КэпВ «объем кэпВ» (6,3 мл).  
 С 11А  
 С 11В
- 30 С 51  
 С 9
- Закачать кэпирующий раствор в реактор и 3 раза выполнить псевдооживление для протекания реакции и повторного осаждения плоского слоя без каналов.
- О 41
- 35 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 3 раза.

О 41

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (3 секунды)

С 41

- 5 О 51, О 38
- Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)
- С 51, С 38

- 10 Прокачать кэпирующий раствор через смолу для протекания части реакции в режиме поршневого потока.

О 41

О 10

Включить насос Р9 со скоростью, обеспечивающей опорожнение реактора примерно за 70 секунд.

- 15 С 41

С 10

О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения.

Промывка в псевдооживленном слое. Проводить 2 раза, но первый раз выполнять псевдооживление 3 раза, а второй раз – 2 раза.

- 20 О 9

О 31

О 51

Закачать АСN в зону подачи кэпирующего раствора (10 мл)

С 31

- 25 С 51

С 9

О 41

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

- 30 Следующие 6 строк повторить 3 раза при первой промывке в псевдооживленном слое и 2 раза при второй промывке в псевдооживленном слое.

О 41

Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 41

- 35 О 51, О 38

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)

С 51, С 58

О 41

5 О 10

Включить насос Р9 со скоростью 30 мл/мин на 20 секунд.

С 41

С 10

10 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения (10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Промывка в режиме поршневого потока.

О 9

О 31

О 51

15 Закачать АСN в зону подачи кэпирующего раствора (10 мл)

С 31

С 51

С 9

О 41

20 Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 40 мл/мин на 15 секунд.

С 41

С 10

25 О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения (10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Промывка в псевдооживленном слое в большем масштабе для промывки верхних стенок реактора (следует отметить, что позже это было сочтено необязательным).

О 9

30 О 31

О 51

Закачать АСN в зону подачи кэпирующего раствора (30 мл)

С 31

С 51

35 С 9

О 41

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

Выполнить следующие 6 строк 3 раза.

О 41

5 Ожидать «время для придавливания слоя под давлением N2» (5 секунд)

С 41

О 51, О 38

Ожидать «время стравливания для псевдооживления слоя посредством барботирования N2» (10 секунд)

10 С 51, С 58

О 41

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 40 мл/мин на 45 секунд.

С 41

15 С 10

О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения (10 фунт/кв.дюйм изб. (68,9 кПа изб.)).

Промывка в режиме поршневого потока.

О 9

20 О 31

О 51

Закачать ACN в зону подачи кэпирующего раствора (10 мл)

С 31

С 51

25 С 9

О 41

Ожидать «время до закачивания в реактор» (8 секунд)

О 10

Включить насос Р9 со скоростью 40 мл/мин на 15 секунд.

30 С 41

С 10

О 9 и ожидать падения давления до заданного пользователем значения.

### **Пример 3. Получение антисмысловой нити HPRT Div22**

Получали ту же бессмысленную нить HPRT Div22, что и в примерах 1 и 2. Синтез этой молекулы с использованием способа с псевдооживленным слоем по настоящему изобретению описан в настоящем документе и включает стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и кэпирования для последовательного введения оставшихся фосфорамидитов. Основные отличия заключаются в следующем. Пример 3 осуществляли в большем масштабе (1 ммоль) и в реакторе большего размера с псевдооживленным слоем, который имеет одинаковый диаметр в направлении снизу вверх, внутренний диаметр 2,2 см и высоту 1 м. В таком реакторе большего диаметра псевдооживление является достаточным без более широкой зоны воронки в верхней части. Чем больше диаметр реактора, тем меньше влияние стенок, поэтому легче обеспечивать полное псевдооживление и перераспределение твердых и жидких веществ без использования верхней секции большого диаметра. Псевдооживление в начале каждой стадии реакции обычно достигало высоты в реакторе около 0,3 м. Кроме того, в примере 3 каждую из реакций, кроме сочетания (деблокирование, окисление, сульфирование и кэпирование), осуществляли посредством загрузки первой порции реагента в реакцию, псевдооживления первой порции в течение требуемого периода времени, затем прокачки первой части через слой смолы в режиме поршневого потока, одновременно загружая вторую порцию реагентов в верхнюю часть реактора, в результате чего все реагенты прокачивали в режиме поршневого потока. Как и в примерах 1 и 2, в примере 3 использовали большой избыток промывочного растворителя и раствора реагента DCA. См. пример 7, где описан пример с уменьшенным количеством реагента DCA, и см. примеры 6, 8 и 9, где описаны примеры промывки с уменьшенным количеством ACN. В таблице 31 представлено руководство по различным вариантам реализации в примерах реакторов с псевдооживленным слоем.

В конце промывки растворителем ACN, после сливания, высота слоя смолы достигала 9 см, и к концу эксперимента составляла 7 см в сухом состоянии. Максимальная высота слоя смолы 11 см была достигнута в конце заключительных стадий деблокирования и окисления после сливания. Максимальный перепад давления через слой смолы составлял 20 фунтов/кв. дюйм изб. (137,9 кПа изб.) в любой момент эксперимента, поскольку это было давление подачи азота, используемого для продавливания жидкости через слой смолы. Для реакций сочетания использовали два эквивалента амидита, как в примере 2. Общие условия синтеза представлены в таблице 6.

Таблица 6. Условия синтеза в примере 3

Элемент	Значение	Единицы
Загрузка смолы	299	мкмоль/грамм
Исходное количество смолы	3,344	грамм
Масштаб синтеза	1	ммоль
Деблокирующий раствор, количество на один цикл	528	мл
Время реакции деблокирования	7	мин
Концентрация амидита	0,1	М в ACN
Количество эквивалентов амидита	2	экв.
Концентрация активатора	0,5	М в ACN
Количество эквивалентов активатора	10	экв.
Раствор амидита, количество на один цикл	20	мл
Раствор активатора, количество на один цикл	20	мл
Время реакции сочетания	10	мин
Количество эквивалентов йода	3	экв.
Раствор окислителя, количество на один цикл	60	мл
Концентрация раствора йода	0,05	М
Время окисления	2,8	мин
Количество эквивалентов сульфорирующего реагента	3	экв.
Сульфорирующий раствор, количество на один цикл	150	мл
Концентрация гидрида ксантана	0,02	М
Время сульфирования	3	мин
Кэпирующий раствор А, количество на один цикл	70	мл
Кэпирующий раствор В, количество на один цикл	70	мл
Время кэпирования	3	мин

Начинали с mU, связанного известными способами со смолой NittoPhase HL 2' OMeU(bz) 300 (299 мкмоль/г) (далее упоминаемого как «mU-смола»), со ссылкой на фиг. 5, где показана установка аппарата синтезатора. Помещали 3,344 г (1,00 ммоль) mU-смолы в реактор с внутренним диаметром 2,2 см с фильтрующей фриттой на дне. Исходная глубина сухой смолы составляла примерно 3 см в высоту.

Растворы реагентов и амидитов получали таким же образом, как описано в примере 1 и в примере 2. Заполняли все насосы и линии подачи. Пропускали АСН через слой молекулярных сит на пути в питающую емкость с инертной атмосферой. Для всех сырьевых материалов использовали перистальтические насосы и питающие емкости. Растворы амидитов хранили отдельно в питающих емкостях, обозначенных «АМ. 1 л» и присоединенных к перистальтическим насосам, подключенным к вентилям V1A – V8A на фиг. 5. Фосфорилирующий реагент хранили в питающей емкости, обозначенной «АМ. 1 л» и присоединенной к перистальтическому насосу, подключенному к вентилю V9A на фиг. 5. Растворы активатора и ДЭА хранили в питающих емкостях, обозначенных «Актив. 5 гал» и «ДЭА», соответственно, на фиг. 5. Как и на фиг. 3, ацетонитрил на фиг. 5 сокращенно обозначен как «АСН».

Для каждого фосфорамидита, добавленного в синтез, последовательно выполняли стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования, если в последовательности присутствует связь P=S) и кэпирования, как описано ниже.

На каждой стадии псевдооживление слоя смолы выполняли в два различных периода времени: первый раз, когда в реактор загружали смесь реагентов и подвергали смолу ее воздействию, и второй раз, когда в реакторе осуществляли некоторые стадии промывки растворителем. Однако во время реакции сочетания псевдооживление периодически продолжали лишь в течение 10-минутного времени сочетания. Как и в примере 2, псевдооживление осуществляли посредством пропускания газообразного азота вверх через нижний сетчатый фильтр, открывая вентили 58, 54 и 53 (V58, V54, V53 на фиг. 5), одновременно с открыванием выпускного вентиля V52. Если в процедуре указано, что жидкость прокачивают вниз через слой смолы, это означает, что сливной насос на выходе из нижней части реактора работает с установленным заданным значением, в то время как давление азота давит на верхнюю часть слоя смолы, продавливая жидкость вниз. Перистальтический насос предназначен для измерения расхода жидкости через слой с регулируемой скоростью.

**Реакция деблокирования:** Загрузить деблокирующий раствор (100 мл) в зону подачи. Прокачать деблокирующий раствор в зону подачи с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать деблокирующий раствор в реактор. Дважды выполнить псевдооживление слоя смолы для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Общее время обоих псевдооживлений составляет примерно 1 минуту. Начать прокачивание деблокирующего раствора вниз через слой смолы при заданной скорости насоса 110 мл/мин в течение 315 секунд. Одновременно в реактор закачать дополнительное количество деблокирующего

раствора (428 мл), чтобы он поступал в верхнюю часть реактора примерно с такой же скоростью, с которой его выкачивают. Всего за 315 секунд через слой смолы прокачивали 528 мл. Прокачать деблокирующий раствор в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать оставшийся деблокирующий раствор для сливания в отходы  
5 через дно фильтра.

Промывка № 1 (выполнить 2 раза): загрузить в реактор растворитель ACN по линии подачи кислоты (50 мл). Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить в отходы.

Промывка № 2: загрузить в реактор растворитель ACN по линии подачи  
10 растворителя (90 мл). Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать с помощью азота вниз по реактору и в нижнюю часть зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57). Дважды выполнить псевдооживление слоя смолы для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Начать прокачивание  
15 растворителя ACN через слой смолы при заданной скорости насоса 100 мл/мин в течение 120 секунд. Одновременно в реактор закачать дополнительное количество растворителя ACN (110 мл), чтобы он поступал в верхнюю часть реактора примерно с такой же скоростью, с которой его выкачивают. Всего через слой смолы прокачивали 200 мл. Прокачать оставшийся растворитель ACN для сливания в отходы через дно фильтра.

Промывка №3 (выполнить 2 раза): загрузить в реактор растворитель ACN по линии  
20 подачи растворителя (40 мл). Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить в отходы через вентиль 57 для очистки зоны принудительного псевдооживления между вентилями 54 и 57 и сливной трубки.

**Реакция сочетания:** каждый из шести амидитов имеет свой отдельный насос, вентили и свою линию подачи в зону активации, как показано на фиг. 5 (зона активации обозначена как «2 л») для минимизации вероятности перекрестного загрязнения. При сборке использовали только 6 амидитов, но всего было 9 амидитов (mA, mC, mG, mU, fA, fC, fG, fU, и Phos) и 10 отверстий в зоне амидитов (включая активатор).

Загружали растворитель ACN в зону активации амидита (80 мл) и прокачивали его  
30 вниз по реактору в отходы, промывая также зону принудительного псевдооживления между вентилями 54 и 57.

Закачивали указанный амидит (20 мл) в зону активации амидита и прокачивали его азотом. Закачивали раствор активатора (20 мл) в зону активации амидита и прокачивали его  
35 азотом. Прокачивали полученную смесь в зону подачи, а затем в реактор для инициации

реакции сочетания на смоле. Для смешивания содержимого осуществляли однократное псевдооживление смолы в реакторе каждые 30 секунд в течение 10 минут реакции сочетания. (Другими словами, псевдооживление осуществляли в течение 15 секунд каждые 30 секунд). По истечении времени реакции прокачивали раствор для реакции сочетания в отходы через дно фильтра.

Промывка №1 (выполнить 2 раза): загрузить растворитель ACN в зону активации амидита (100 мл), затем прокачать его вниз по реактору в отходы, промывая также зону принудительного псевдооживления между вентилями 54 и 57.

Промывка №2 (выполнить 2 раза): загрузить ACN (40 мл) в реактор по линии подачи растворителя. Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить из реактора в отходы, и одновременно использовать растворитель для очистки зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57) и сливных насосных трубок.

**Реакция окисления** (если требуется вместо сульфирования): загрузить ACN (100 мл) в зону смешивания активатора амидита, чтобы он был готов к промывке смолы сразу по окончании реакции окисления. Загрузить окислительный раствор (59 мл) в зону подачи, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок. Прокачать раствор в реактор и дважды выполнить псевдооживление слоя смолы для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Общее время обоих псевдооживлений составляет примерно 1,2 минуты. Начать прокачивание раствора окислителя через слой смолы при заданной скорости насоса 130 мл/мин в течение 30 секунд. Одновременно в реактор закачать дополнительное количество раствора йода (1 мл), чтобы он поступал в верхнюю часть реактора примерно с такой же скоростью, с которой его выкачивают. Прокачать раствор йода в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Всего за 30 секунд через слой смолы прокачивают 60 мл окислительного раствора. Прокачать оставшийся окислительный раствор для сливания в отходы через дно фильтра. Через реактор прокачать 100 мл промывочного растворителя ACN (из зоны смешивания активатора амидита) для промывки смолы.

Промывка №1 (выполнить 2 раза): в реактор загрузить ACN (50 мл) по линии подачи окислительного раствора, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить в отходы.

Промывка №2: в зону подачи загрузить ACN (40 мл) по линии подачи растворителя. Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить из реактора в отходы, и

одновременно использовать растворитель для очистки зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57) и сливных насосных трубок.

Промывка №3: в зону подачи загрузить ACN (90 мл) по линии подачи растворителя. Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель с помощью азота вниз по реактору и в нижнюю часть зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57). Выполнить псевдооживление слоя смолы 2 раза для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Начать прокачивание растворителя ACN через слой смолы при заданной скорости насоса 100 мл/мин в течение 130 секунд. Одновременно в реактор закачать дополнительное количество ACN (110 мл), чтобы он поступал в верхнюю часть реактора примерно с такой же скоростью, с которой его выкачивают. Всего через слой смолы прокачивают 200 мл. Прокачать оставшийся растворитель ACN для сливания в отходы через дно фильтра.

Промывка №4 (выполнить 2 раза): в зону подачи загрузить ACN (40 мл) по линии подачи растворителя. Прокачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить из реактора в отходы, и одновременно использовать растворитель для очистки зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57) и сливных насосных трубок.

**Реакция сульфирования (тиолирования)** (если требуется вместо окисления): загрузить раствор гидрида ксантана (90 мл) в зону подачи и в реактор. Прокачать раствор в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Дважды выполнить псевдооживление слоя смолы для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Общее время обоих псевдооживлений составляет примерно 1 минуту. Начать прокачивание раствора гидрида ксантана через слой смолы при заданной скорости насоса 130 мл/мин в течение 80 секунд. Одновременно в реактор закачать дополнительное количество раствора гидрида ксантана (60 мл), чтобы он поступал в верхнюю часть реактора примерно с такой же скоростью, с которой его выкачивают. Прокачать раствор гидрида ксантана в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Всего за 80 секунд через слой смолы прокачивают 150 мл. Прокачать оставшийся раствор гидрида ксантана для сливания в отходы через дно фильтра.

Промывка №1 (выполнить 2 раза): загрузить ACN (50 мл) в реактор по линии подачи раствора гидрида ксантана. Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и сливали в отходы.

Промывка № 2: загрузить ACN (40 мл) в реактор по линии подачи растворителя. Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить из реактора в отходы, и одновременно использовать растворитель для очистки зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57) и сливных насосных трубок.

Промывка № 3: в реактор загрузить ACN (90 мл) по линии подачи растворителя, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель с помощью азота вниз по реактору и в нижнюю часть зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57). Выполнить псевдооживление слоя смолы 2 раза для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Начать прокачивание растворителя ACN через слой смолы при заданной скорости насоса 100 мл/мин в течение 130 секунд. Одновременно в реактор закачать дополнительное количество ACN (110 мл), чтобы он поступал в верхнюю часть реактора примерно с такой же скоростью, с которой его выкачивают. Всего через слой смолы прокачивают 200 мл ACN. Прокачать оставшийся растворитель для слива в отходы через дно фильтра.

Промывка №4 (выполнить 2 раза): загрузить ACN (40 мл) в реактор по линии подачи растворителя. Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить из реактора в отходы, и одновременно использовать растворитель для очистки зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57) и сливных насосных трубок.

**Реакция кэпирования:** загрузить кэпирующий раствор А и кэпирующий раствор В в реактор (по 45 мл каждого), прокачивая каждый раствор в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Дважды выполнить псевдооживление слоя смолы для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Общее время обоих псевдооживлений составляет примерно 1 минуту. Начать прокачивание смеси кэпирующего раствора А и кэпирующего раствора В через слой смолы при заданной скорости насоса 130 мл/мин в течение 70 секунд. Одновременно в реактор закачать дополнительное количество кэпирующего раствора А и кэпирующего раствора В (по 25 мл каждого), чтобы они поступали в верхнюю часть реактора примерно с такой же скоростью, с которой их выкачивают. Прокачать кэпирующий раствор А и кэпирующий раствор В в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Всего за 70 секунд через слой смолы прокачивают 140 мл. Прокачать оставшийся кэпирующий раствор А и кэпирующий раствор В в отходы через дно фильтра.

Загрузить ACN в реактор по линиям подачи кэпирующего раствора А и кэпирующего раствора В (по 50 мл каждого), прокачивая азотом в реактор для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить в отходы.

5 Промывка №2 (выполнить 2 раза): загрузить ACN (40 мл) в реактор по линии подачи растворителя. Прокачать промывочный растворитель в реактор с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель через слой смолы и слить из реактора в отходы, и одновременно использовать растворитель для очистки зоны принудительного псевдооживления (между V54 и V57) и сливных насосных трубок.

10 После завершения последнего цикла сочетания повторяли цикл, используя фосфорилирующий раствор вместо амидита. После сочетания и окисления фосфорилирующего реагента повторяли стадию деблокирования. Проводили реакцию смолы с 500 мл раствора ДЭА в течение 10 минут. Промывали ACN и сушили, пропуская азот вниз через слой смолы в течение 30 минут, с получением 11,96 мг высушенного  
15 продукта на смоле. Для образца брали 200 мг продукта + смолы, и первоначально использовали 3,344 г смолы, после чего осталось 8,636 г (выход неочищенной массы 94%) защищенного олигонуклеотидного продукта.

Для небольшого образца выполняли реакцию отщепления и снятия защиты с использованием концентрированного раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$  при 50 °С в течение 4 часов. По  
20 данным СВЭЖХ, отщепленный олигонуклеотидный продукт, лишенный защиты, имеет чистоту 77,8% по проценту площади пика, как показано в таблице результатов СВЭЖХ для примеров с 1 по 5 (таблица 13). Анализ ЖХМС подтверждает, что пик основного продукта представляет собой правильную антисмысловую нить HPRT div22.

#### 25 **Пример 4. Получение антисмысловой нити HPRT Div22**

В данном примере получали ту же антисмысловую нить HPRT Div22, что и в примерах 1, 2 и 3. Как и в примерах 1, 2 и 3, синтез молекулы с использованием способа с псевдооживленным слоем по настоящему изобретению описан в настоящем документе и включает стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и  
30 кэпирования для последовательного введения оставшихся фосфорамидитов. В данном эксперименте использовали такой же реактор и способ, как в примере 2. Основные отличия заключались в том, что масштаб был меньше (масштаб 0,1 ммоль вместо масштаба 0,18 ммоль), нагрузка смолы была больше (299 мкмоль/г вместо 246 мкмоль/г), таким образом, слой смолы не был столь высоким, и время деблокирования и промывки после  
35 деблокирования было меньше для более короткого слоя смолы в примере 4. Для

эксперимента использовали 0,3346 г смолы Nittophase HL 2'OMeU300 партии EO5005, нагрузка 299 мкмоль/г. Для сочетания mU17, fA18 и fU22 использовали 2,5 эквивалента амидита (циклы 17, 18 и 21) и 12,5 эквивалента активатора, но для всех остальных стадий сочетания амидита использовали 2,0 эквивалента амидита и 10 эквивалентов активатора, как в примере 2. Как и в примерах 1, 2 и 3, в примере 4 использовали большой избыток промывочного растворителя и раствора реагента DCA. См. пример 7, где описан пример с уменьшенным количеством реагента DCA, и см. примеры 6, 8 и 9, где описаны примеры промывки с уменьшенным количеством ACN. В таблице 31 представлено руководство по различным вариантам реализации в примерах реакторов с псевдооживленным слоем.

Использовали растворы реагентов, описанные в таблице 7.

Таблица 7. Растворы реагентов для примера 4.

Название раствора	Содержание	Партия	Поставщик
Основной растворитель	ACN	205641	Fisher
Деблокирование	3% об. дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле	DZ124-US, DZ944-US	Honeywell
Активатор	0,5 М 5-(этилтио)-1H-тетразола в ACN	DW336-US	Honeywell
Кэпирующий раствор А	1-Метилимидазол/ACN (20/80 об./об.)	DZ847	Honeywell
Кэпирующий раствор В	1:1 смесь В1 и В2		
Кэпирующий раствор В1	40% об. уксусного ангидрида в ACN	DX994US	Honeywell
Кэпирующий раствор В2	60% об. 2,6-лутидина в ACN	DY020US	Honeywell
ДЭА	20% диэтиламина в ACN (20/80 об./об.)	STBJ15069	Honeywell
Окисление	0,05 М йода в смеси пиридин/вода (90/10 об./об.)	DZ225-US	Honeywell
Сульфирование	0,2 М гидроксида ксантана в смеси ACN/пиридин (70/30 об./об.)		
Фосфорилирование	0,1 М 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]этил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)фосфорамидит в ACN		Honeywell

Получали 0,1 М растворы амидитов, указанных ниже в таблице 8. Взвешивали твердый амидит во флаконе и вставляли впитывающий вкладыш, затем добавляли ACN до достижения концентрации 0,1 М. Условия синтеза для примера 4 представлены в таблице 9. Использовали такой же способ синтеза, как описан в примере 2, также со ссылкой на фиг. 3.

Таблица 8. Состав растворов амидитов для примера 4.

Название раствора амидита	Используемый амидит	Поставщик	Партия	масса (г)	ACN (г)
2'-O-Me-A	DMT-2'-O-Me-A(bz) амидит	ThermoFisher	VB2462	4,44	39,23
2'-O-Me-C	DMT-2'-O-Me-C(Ac) амидит	ThermoFisher	VD1432	2,4	23,73
2'-O-Me-G	DMT-2'-O-Me-G(iBu) амидит	ThermoFisher	VB2272	2,62	23,82
2'-O-Me-U	DMT-2'-O-Me-U амидит	ThermoFisher	VB2282	2,27	23,67
2'-F-dA	DMT-2'-F-dA(Bz) амидит	ThermoFisher	VB2242	2,2	19,58
2'-F-dU	DMT-2'-F-dU амидит	ThermoFisher	VB2262	1,87	19,68
Phos		Hongene	LPR22B1A1	Не применимо	Не применимо

Таблица 9. Условия синтеза в примере 4.

5

Элемент	Значение
Загрузка смолы	299 мкмоль/г
Исходное количество смолы	0,3346 г
Масштаб синтеза	100 мкмоль
Деблокирующий раствор, количество на один цикл	36 мл для циклов 1-12, 45 мл для циклов 13-24
Время контакта для деблокирования	от 9 до 10 мин
Концентрация амидита	0,1 М в ACN
Количество эквивалентов амидита	2 экв. для большинства циклов, но 2,5 экв. для циклов 17, 18 и 21
Раствор амидита, количество на один цикл	2 мл для большинства циклов, но 2,5 мл для циклов 17, 18 и 21
Концентрация активатора	0,5 М в ACN
Количество эквивалентов активатора	10 экв. для большинства циклов, но 12,5 экв. для циклов 17, 18 и 21
Раствор активатора, количество на один цикл	2 мл для большинства циклов, но 2,5 мл для циклов 17, 18 и 21
Количество эквивалентов окислителя	2,2 экв. для циклов 3 и 4, 2,4 экв. циклов 5-20, 23
Время окисления	6 мин
Количество эквивалентов сульфлирующего реагента	13 экв.
Время сульфирования	8 мин
Кэпирующий раствор А, количество на один цикл	3,5 мл
Кэпирующий раствор В, количество на один цикл	3,5 мл
Время кэпирования	4 мин

Высота слоя смолы во время фазы нисходящего потока на последней стадии деблокирования составляла 12,7 см, таким образом, высота слоя смолы составляла менее половины по сравнению с примером 2. Максимальный перепад давления через слой смолы во время эксперимента составлял 15 фунт/кв. дюйм изб. (103,4 кПа изб.), поскольку это было 5 давление подачи азота, используемого для прокачивания жидкости через слой смолы. Высота слоя смолы от начала до конца синтеза представлена в таблице 10.

Таблица 10. Высота слоя смолы от начала до конца синтеза для примера 4.

цикл	амидит	Высота слоя смолы, смоченной ACN, в начале цикла (см)	Высота слоя смолы, смоченной толуолом, после деблокирования (см)
1	mA*	3,4	5,5
2	mA*	нет данных	6,8
3	mG	4,1	7,2
4	mG	4,7	7,4
5	mA	5,1	7,7
6	mU	5,5	8,2
7	fA	5,8	8,5
8	mC	6,1	8,9
9	fU	6,4	9,3
10	mG	6,8	9,5
11	mA	7,2	9,6
12	mC	7,2	9,5
13	mA	7,4	9,8
14	mU	7,6	10,1
15	mC	7,9	10,4
16	mU	8,2	10,6
17	fA	8,5	10,8
18	mA	8,8	11,2
19	mA	9,1	11,5
20	mA	9,4	11,8
21	fU*	9,7	12,1
22	mA*	9,9	12,2
23	Phos	10,1	12,4
24	Окончательное деблокирование	10,3	12,7

После последней обработки ДЭА осуществляли промывку ACN и сушили, пропуская азот вниз через слой смолы, с получением 1,1458 г сухой смолы. Это

соответствует увеличению массы на 0,811 г, но не включает поправку на массу образца, которая составляла примерно 6% от всего материала. Прирост неочищенной массы составлял 8,60 г/ммоль, что соответствует выходу неочищенной массы примерно 93%. Выполняли реакцию отщепления и снятия защиты в образце массой 21,9 мг с использованием 0,5 мл концентрированного раствора NH<sub>4</sub>OH при 55 °С в течение 4 часов. По данным СВЭЖХ, отщепленный олигонуклеотидный продукт, лишенный защиты, имеет чистоту 84,5% по проценту площади пика, как показано в таблице результатов СВЭЖХ для примеров с 1 по 5 (таблица 13). Анализ ЖХМС подтверждает, что пик основного продукта представляет собой правильную антисмысловую нить HPRT div22.

10

### **Пример 5. Сравнение с синтезатором олигонуклеотидов Cytiva ÄKTA**

Такую же антисмысловую нить HPRT Div22 из примеров 1-4 получали также в автоматизированном синтезаторе олигонуклеотидов Cytiva ÄKTA, исходя из смолы NittoPhase HL 2' OMeU 250 (246 мкмоль/г, 0,603 г, 148,4 мкмоль), выполняя последовательно те же стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования, если в последовательности присутствует связь P=S) и кэпирования. Условия синтеза для примера 5 представлены в таблице 11.

15

Таблица 11. Условия синтеза для примера 5.

эксперимент	
синтезатор	Cytiva AKTA OP100
партия смолы	G07010
Нагрузка смолы, мкмоль/г	246
Исходное количество смолы, г	0,603
Масштаб синтеза, мкмоль	148,4
Объем реактора, мл	6,3
Диаметр реактора, см	2
Высота реактора, см	2
Прокачивание ACN после сочетания, окисления, тиолирования, кэпирования	2 объема колонки
Деблокирование	10% об. дихлоруксусной кислоты (DCA) в толуоле
Деблокирующий раствор, количество на цикл, мл	(31~58), в среднем 50
Линейная скорость деблокирования, см/ч	300

Объем ACN для промывки после деблокирования, мл	37,8
Концентрация амидита, М в ACN	0,1
Количество эквивалентов амидита, экв.	2
Реагент-активатор	0,5 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ACN
Количество эквивалентов активатора, экв.	10
Время сочетания, мин	10
Объем ACN для промывки после сочетания, мл	25,2
Окислительный реагент	0,05 М йода в смеси пиридин/вода (90/10 об./об.)
Количество эквивалентов окислителя, экв.	3
Время контакта при окислении, мин	2,5
Объем ACN для промывки после окисления, мл	25,2
Сульфорирующий реагент	0,2 М гидрида ксантана в смеси ACN/пиридин (70/30 об./об.)
Количество эквивалентов сульфорирующего реагента, экв.	13
Время контакта при сульфировании, мин	6
Объем ACN для промывки после сульфирования, мл	12,6
Кэпирующий раствор А	1-Метилимидазол/ACN (20/80 об./об.)
Кэпирующий раствор В	1:1 смесь В1 и В2
Кэпирующий раствор В1	40% об. уксусного ангидрида в ACN
Кэпирующий раствор В2	60% об. 2,6-лутидина в ACN
Кэпирующий раствор А, количество на цикл, мл	6,3
Кэпирующий раствор В, количество на цикл, мл	6,3
Время контакта при кэпировании, мин	1
Объем ACN для промывки после кэпирования, мл	18,9
ДЭА	20% диэтиламина в ACN (20/80 об./об.)
Время контакта с ДЭА, мин	10
Объем ДЭА, мл	40
Объем ACN для промывки ДЭА (окончательная промывка), мл	50,4

После завершения синтеза и сушки смолы измеренный прирост массы составил 8,64 г/ммоль, что составляет 94% прироста неочищенной массы. Измеренный выход неочищенного продукта составил 169 OD/ммоль. После отщепления и снятия защиты олигонуклеотидный продукт имел чистоту 80,28% по СВЭЖХ. Анализ ЖХМС подтверждает, что пик основного продукта представляет собой правильную антисмысловую нить HPRT div22. Выход неочищенного продукта и чистота олигонуклеотидного продукта сопоставимы с продуктом, полученным в примерах 1-4, как показано в таблице 13. Однако в системе Cytiva ÄKTA слой смолы является неподвижным, и все реагенты и растворители проходят через слой смолы в режиме «поршневого потока». Ограничение такой системы заключается в том, что высота слоя смолы не может превышать 10 см без негативных последствий, таких как увеличение перепада давления на слое смолы и образование каналов внутри слоя смолы. Высота слоя смолы в примере 5 составляла не более 2 см. Напротив, настоящее изобретение может обеспечивать использование более высоких значений высоты слоя смолы (максимальная высота слоя во время эксперимента, описанного в примере 2, составляла 30 см во время фазы нисходящего прокачивания при проведении реакций), что увеличивает размер производимой партии для данного диаметра реактора и способствует гибкому изменению размера партии для данного реактора.

Обобщение условий осуществления метода ион-парной СВЭЖХ для анализа чистоты антисмысловой нити HPRT div22 представлено в таблице 12.

Таблица 12. Обобщение условий осуществления метода ион-парной СВЭЖХ для анализа чистоты антисмысловой нити HPRT div22.

Прибор:	Waters I-Class Acquity UPLC с бинарным насосом
Колонка:	50 x 2,1 мм Waters BEH C18, 1,7 мм, 130 А (pn186003949)
Температура колонки:	55 С
Подвижная фаза А:	10 мМ DIPEA, 100 мМ HFIP в воде
Подвижная фаза В:	ACN
Градиент	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Исходные условия: 99% А / 1% В</li> <li>• Увеличение содержания В с 1% до 24,3% за 25 мин</li> <li>• Увеличение содержания В с 24,3 до 100% В за 0,1 мин</li> <li>• Удерживание 100% В в течение 1,9 мин</li> <li>• Уменьшение содержания В с 100% до 1% за 0,1 мин</li> <li>• Удерживание 1% В в течение 2,9 мин</li> <li>• Общая продолжительность 30 мин</li> </ul>
Скорость потока:	0,6 мл/мин
Длина волны:	260 нм

Таблица 13. Сравнение профилей чистоты, выхода и содержания примесей между синтезами на синтезаторах с псевдооживленным слоем из примеров 1-4 и на синтезаторе АКТА ОР100.

а.

Пример синтеза антисмысловой нити HPRT	Пример 1, FBR 31 мкмоль, без барботажа N2	Пример 2, FBR 180 мкмоль, высота слоя 30 см	Пример 3, FBR 1 ммоль	Пример 4, FBR 100 мкмоль	Пример 5, АКТА сравнение с примерами 1-4
масштаб (мкмоль)	31,1	180,1	1000	100	148,4
партия смолы	EO5005	G07010	EO5005	EO5005	G07010
нагрузка смолы (мкмоль/г)	299	246	299	299	246
синтезатор	Фиг. 3	Фиг. 3	Фиг. 5	Фиг. 3	Cytiva АКТА ОР100
высота слоя смолы во время последнего деблокирования, см	2	30	11	13	2
внутр. диам. реактора (см)	1	0,635	2,2	0,635	2
прирост неочищенной массы г/ммоль	8,88	8,833	8,636	8,6	8,64
OD/мкмоль	181	нет данных	нет данных	нет данных	169

b.

	Пример синтеза антисмысловой нити HPRT	Пример 1, FBR 31 мкмоль, без барботажа N2	Пример 2, FBR 180 мкмоль, высота слоя 30 см	Пример 3, FBR 1 ммоль	Пример 4, FBR 100 мкмоль	Пример 5, АКТА сравнение с примерами 1-4
Отн. время удерживания	ID	% площади	% площади	% площади	% площади	% площади
0,521	7-мер					0,32
0,640	9-мер					0,38
0,719	11-мер	0,29		0,44		
0,768	12-мер	0,2		0,34		0,2
0,785	13-мер			0,25		0,25
0,828	14-мер	0,21		0,31		0,24
0,845	15-мер	0,23	0,21	0,33		0,39
0,861	16-мер	0,29	0,24	0,33		0,44
0,881	17-мер	0,65	0,31	0,49	0,3	
0,909	18-мер	0,27	0,28	0,71	0,29	0,43
0,934	19-мер	0,35	0,43	0,52	0,33	0,48
0,950	20-мер	0,39	0,53	0,68	0,45	0,56
0,965	21-мер	0,8	0,82	1,83	0,61	1,2
0,977	22-мер	0,39	0,48	0,58	0,51	0,53
0,984	22-мер с Phos	0,35	0,69	0,24	0,37	0,24
0,991	P=S -> P=O		2,05			
0,994	P=S -> P=O	7,45	4,45	6,74	5,8	4,99
1,000	антисмысловой HPRT	81,85	80,85	77,81	84,45	80,28
1,009	FLP+mA		1,79			2,47
1,014			0,44		0,75	0,81
1,016		0,4	0,46			
1,021		0,33	0,21			0,44
1,025	FLP+mG		0,47	0,87	0,5	
1,030	FLP + mA		0,2	0,34		
1,041		0,34	0,46	0,63	0,28	
1,048			0,21	0,36	0,23	
1,057			0,21	0,26		
1,085				0,25		
1,097				0,38		
1,107				0,27		
1,112				0,42		
1,117		0,26	0,21	0,39		
1,124		0,22		0,42		
1,130		0,43	0,23	0,34	0,26	0,24
1,230		0,26				
1,251		0,21				
1,259		0,29				

**Пример 6. Антисмысловая нить ANGPTL3 в масштабе 51,5 мкмоль, с интеграцией промывочного растворителя из одного цикла в другой**

5 Антисмысловую нить ANGPTL3 получали с использованием способа с псевдооживленным слоем по настоящему изобретению, и он включал стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и кэпирования для последовательного введения фосфорамидитов. Кэпирование не требуется после присоединения фосфорамидита MeMOP в 21 цикле. В данном примере использовали  
10 альтернативную конструкцию синтезатора экспериментального масштаба. В новой конструкции отсутствуют зоны подачи реагентов, кроме амидитов и активатора. В ней использовано меньшее количество насосов с несколькими головками, подключенными параллельно, и интегрировано повторное использование растворителя из одного фосфорамидитного цикла в следующем, что снижает объемы промывочного растворителя.  
15 Эксперимент представляет собой базовый синтез 22-мерной одноцепочечной РНК (антисмысловой нити ANGPTL3) в масштабе 51,5 мкмоль. Последовательность указанной цепи РНК представлена на фиг. 10 и может быть сокращенно записана следующим образом, где \* означает тиолирование вместо окисления:

20 5' MeMOP\*fG\*fU\*fAfUmA fAmCmC fUmUmC mCfAmUmUmUmUmGmA\*mG\*mG3

В качестве реактора использовали PFA трубку с внутренним диаметром 0,63 см и высотой 10 см. Обобщение условий синтеза представлено в таблице 14. Использовали 0,2087 г смолы NittoPhase HL 250 2'OMeG(IBU) и получали на выходе 0,6287 г смолы. Таким образом, прирост неочищенной массы составлял 0,4200 г. В результате  
25 нормализации к масштабу один ммоль получали 8,16 г/ммоль. Результаты СВЭЖХ показали 82,7% FLP. Результаты СВЭЖХ и выхода представлены в таблице 17. Общий OD, нормализованный к масштабу синтеза, составлял 171 OD/мкмоль. Использование растворителя по сравнению с типичным синтезом на синтезаторе Cytiva АКТА OP100  
указано в таблице 15. По сравнению с примерами 1-4, в примере 6 использовали  
30 существенно меньше промывочного растворителя ACN на ммоль. В таблице 31 представлено руководство по различным вариантам реализации в примерах реакторов с псевдооживленным слоем. Сравнение профилей чистоты, выхода и содержания примесей между синтезами, проведенными в реакторе псевдооживленным слоем, изображенным на  
схеме 314, и в синтезаторе АКТА, представлено в таблице 17. Принципиальная схема  
35 синтезатора показана на фиг. 7. Процедуры автоматизации для синтезатора записаны в

таблице 18. Максимальный перепад давления через слой смолы во время эксперимента составлял 15 фунт/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.), поскольку это было давление подачи азота, используемого для прокачивания жидкости через слой смолы.

5 Таблица 14. Обобщение условий синтеза, использованных в примере 6.

Элемент	Условие
Реакция детритилирования	15~18 мл 3% DCA 7~8 минут времени контакта
Объем кислотной промывки ACN	14 мл
Объем ACN для предварительной промывки после сочетания	3 мл
Реакция сочетания	10 минут времени сочетания для всех 2'ОМе-амидитов 20 минут времени сочетания для всех фтораидитов
Объем ACN для промывки после сочетания	9 мл
Реакция сульфирования	3,5 мл 0,2 М раствора ксантангирида в пиридине 5~6 минут времени контакта
Объем ACN для промывки после сульфирования	10 мл
Реакция окисления	2~2,6 мл 0,05 М йода в смеси пиридин/вода (90/10 об./об.) 2 минуты времени контакта
Объем ACN для промывки после окисления	10 мл
Реакция кэпирования	по 1 мл каждого реагента КэпА и КэпВ 1 минута времени контакта
Объем ACN для промывки после кэпирования	10 мл

Таблица 15. Использование растворителя по сравнению с типичным синтезом на синтезаторе Cytiva АКТА OP100.

	Значения «АКТА сравнение 3» (таблица 17) в масштабе, уменьшенном до 50 мкмоль	Пример 6 (таблица 17), в масштабе 51,5 мкмоль
Все кислотные промывки	14	10,44
Предварительная промывка после сочетания	4	3,8
Прокачивание после сочетания	2,33	0
Промывка после сочетания	10	0
Всего после сочетания	16,33	3,8
Дополнительная промывка А реактора	0	8
Прокачивание после тиолирования	4,33	0
Промывка после тиолирования	4,67	1,44
Всего после тиолирования	9	1,44
Прокачивание после окисления	4,33	0
Промывка после окисления	6	1,47
Всего после окисления	10,33	1,47
Прокачивание после кэпирования	4,33	0
Промывка после кэпирования	7,33	2,93
Всего после кэпирования	11,67	2,93
Дополнительная промывка В реактора	0	6
Всего ACN за цикл окисления	52,33	32,64
Всего ACN за цикл сульфирования	51	32,62
Среднее использование ACN	52,02	32,63
Уменьшение объема ACN по сравнению с исходным значением для АКТА (%)	100%	37%

5 Для сравнения на синтезаторе АКТА OP100 были проведены четыре эксперимента. Они представлены в таблице 17.

10 Материалы и условия, использованные в синтезаторе АКТА OP100 для проведения четырех экспериментов, указаны в таблице 16.

Во всех 4 экспериментах в таблице 16 использовали:

- Cytiva АКТА OP100
- Смола Kinnovate NittoPhase HL-2'-OMeG(iBu) 250, партия G08004, нагрузка 247 мкмоль/г.
- 15 • Деблокирование, дихлоруксусная кислота (DCA) в толуоле

- Прокачивание 2 объемов колонки ACN после сочетания, окисления, тиолирования, кэпирования
- Количество эквивалентов амидита = 2 экв.
- Реагент-активатор, 0,5 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ACN
- 5 • Время сочетания = 10 мин.
- Окислительный реагент, 0,05 М йода в смеси пиридин/вода (90/10 об./об.)
- Количество эквивалентов окислителя = 4 экв.
- Время контакта при окислении = 3 мин.
- Сульфлирующий реагент, 0,2 М гидрида ксантана в смеси ACN/пиридин (70/30
- 10 об./об.)
- Количество используемого гидрида ксантана, 2 объема колонки
- Гидрид ксантана = 13 экв.
- Время контакта при сульфировании = 5,5 мин
- Кэпирующий раствор А, 1-метилимидазол/ACN (20/80 об./об.)
- 15 • Кэпирующий раствор В, 1:1 смесь В1 и В2
- Кэпирующий раствор В1, 40% об. уксусного ангидрида в ACN
- Кэпирующий раствор В2, 60% об. 2,6-лутидина в ACN
- Общее количество кэпирующих растворов А и В в смеси 50/50 об./об. = 2 объема колонки
- 20 • Время контакта с кэпирующим раствором = 0,5 мин
- ДЭА, 20% диэтиламина в ACN (20/80 об./об.)
- Время контакта с ДЭА = 10 мин
- Объем ДЭА = 10 мл

Таблица 16. Условия эксперимента в Cytiva АКТА.

эксперимент	АКТА сравнение 1	АКТА сравнение 2	АКТА сравнение 3	АКТА сравнение 4
Масштаб синтеза, мкмоль	626	160,8	161,8	149,7
Объем реактора, мл	25	6,3	6,3	6,3
Диаметр реактора, см	2,54	2	2	2
Высота реактора, см	4,93	2	2	2
Деблокирование, % об. DCA	10	3	3	3
Деблокирующий раствор, среднее количество на цикл, мл	150,5	41,2	42,4	44,6
Линейная скорость деблокирования, см/ч	469	200	200	200
Объем ACN для промывки после деблокирования, мл	150	38	13 мл ACN, затем 6 мл 20% лутидина в ACN, затем 25 мл ACN	37,8
Концентрация амидита, М в ACN	0,2	0,2	0,2	0,1
Количество эквивалентов активатора, экв.	7	7	7	10
Объем ACN для промывки после сочетания, мл	100	25	25	25,2
Объем ACN для промывки после окисления, мл	29	12	12	12,6
Объем ACN для промывки после сульфирования, мл	38	10	10	9,45
Объем ACN для промывки после кэпирования, мл	75	19	19	18,9
Объем ACN для промывки ДЭА (окончательная промывка), мл	200	50	50	50,4

- 5 В каждом эксперименте, перечисленном в таблице 16, после высушивания связанного со смолой олигонуклеотида суспендировали примерно 20 мг смолы в 0,50 мл NH<sub>4</sub>OH и встряхивали при 55 °С в течение 4 часов или при 38 °С в течение 18 часов. Фильтровали смолу и анализировали фильтрат методом СВЭЖХ (50 мкл фильтрата, разбавленного 1,5 мл воды). Чистота по СВЭЖХ указана в таблице 17.

Таблица 17. Сравнение профилей чистоты, выхода и содержания примесей между синтезами примеров 6-10, полученных на синтезаторе с псевдооживленным слоем, и на синтезаторе АКТА ОР100.

а.

Пример синтеза антисмысловой нити MeMOP	Пример 6, FBR 50 мкмоль, с повторным использованием ACN	Пример 7, FBR 100 мкмоль, с повторным использованием DCA	Пример 8, FBR 10 мкмоль, с повторным использованием ACN	Пример 9, FBR 10 мкмоль, с повторным использованием DCA и многократной промывкой	Пример 10, FBR 10 мкмоль, наименьшее количество промывочного растворителя
Масштаб (ммоль)	0,0515	0,10042	10,00	10,06	10
Синтезатор	Фигура 7	Фигура 8	Фигура 9	Фигура 11	Фигура 11
партия смолы	G08004	H08023	G08004	H08023	H08023
нагрузка смолы (мкмоль/г)	247	249	247	249	249
прирост неочищенной массы (г/ммоль)	8,16	8,13	7,99	7,55	7,61
ОД/мкмоль	171	181	161	166	179
высота слоя смолы во время последнего деблокирования, см	7	12	6	6	6
внутр. диам. реактора (см)	0,63	0,63	10	10	10

b.

Пример синтеза антисмысловой нити MeMOP	АКТА сравнение 1, 626 мкмоль	АКТА сравнение 2, 161 мкмоль	АКТА сравнение 3, 162 мкмоль	АКТА сравнение 4, 150 мкмоль
Масштаб (ммоль)	0,626	0,1608	0,1618	0,1497
Синтезатор	Cytiva АКТА OP100	Cytiva АКТА OP100	Cytiva АКТА OP100	Cytiva АКТА OP100
партия смолы	G08004	G08004	G08004	G08004
нагрузка смолы (мкмоль/г)	247	247	247	247
прирост неочищенной массы (г/ммоль)	8,26	7,06	6,16	7,54
ОД/мкмоль	158,54	149	135,67	165
высота слоя смолы во время последнего деблокирования, см	5	2	2	2
внутр. диам. реактора (см)	2,54	2	2	2

c.

	Пример синтеза антисмысловой нити MeMOP	Пример 6, FBR 50 мкмоль, с повторным использованием ACN	Пример 7, FBR 100 мкмоль, с повторным использованием DCA	Пример 8, FBR 10 ммоль, с повторным использованием ACN	Пример 9, FBR 10 ммоль, с повторным использованием DCA и многократной промывкой	Пример 10, FBR 10 ммоль, наименьшее количество промывочного растворителя
Отн. время удерживания	ID	% площади	% площади	% площади	% площади	
0,387						
0,483	7-мер		0,35			
0,547	8-мер		0,41			
0,627	9-мер		0,28			
0,663	10-мер		0,24		0,27	
0,703	11-мер				0,28	
0,743	12-мер				0,34	0,24
0,778	13-мер		0,55		0,36	
0,807	14-мер		0,27		0,31	0,24
0,831	15-мер		0,34	0,27	0,53	0,38
0,869	16-мер		0,35	0,26	0,44	0,38
0,911	17-мер		0,76	0,59	0,51	0,55
0,915	18-мер	0,22	0,53	0,63	0,63	0,61
0,937	19-мер	0,24	0,78	0,92	2,08	0,75
0,956	20-мер	0,33	0,62	1,05	0,84	0,79
0,963	21-мер PO		0,57		0,4	0,25
0,972	21-мер	0,38	2,02	1,64	1,88	0,96
0,979						
0,984		0,54			0,48	
0,986	PS на PO и N-1	0,71	1,6	1,07	0,75	1,04

0,989	PS на PO		1,98			
0,993	PS на PO	5,31	2,5	4,14	4,01	3,06
0,995	относительно PS на PO			1,64		
1	FLP	82,7	79,92	79,5	77,89	82,32
1,006						
1,008		0,67	1,18		0,55	0,47
1,01		0,58		1,23	0,33	0,45
1,013		1,36	0,76	0,85	0,46	0,42
1,016					0,45	0,47
1,023	Плюс 14,02 Да**	3,06	2,77	3,26	3,2	3,04
1,03	изобутерилы*			0,24		
1,04	изобутерилы*	0,21		0,5	0,28	0,23
1,05	изобутерилы*			0,27	0,38	0,32
1,07	изобутерилы*					
1,1	изобутерилы*	0,22				
1,13		0,24				
1,14		0,25				
	общий % площади показанных пиков (не показаны пики <0,2%)	97,02	98,78	98,06	97,65	96,01
	общий % площади до главного	7,73	14,15	12,21	14,11	8,29
	общий % площади после главного	6,59	4,71	6,35	5,65	5,4
	Пики, связанные с заменой PS на PO, отн. время удерживания 0,986, 0,989, 0,993, 0,995	6,020	6,080	6,850	4,760	4,100

d.

	Пример синтеза антисмысловой нити MeMOP	АКТА сравнение 1, 626 мкмоль	АКТА сравнение 2, 161 мкмоль	АКТА сравнение 3, 162 мкмоль	АКТА сравнение 4, 150 мкмоль
Отн. время удерживания	ID	% площади	% площади	% площади	% площади
0,387			0,22		
0,547	8-мер	0,23	0,35	1,63	
0,627	9-мер	0,2		0,31	
0,663	10-мер	0,22	0,29		
0,703	11-мер	0,3	0,28	0,21	
0,743	12-мер	0,38	0,53	0,45	
0,778	13-мер	0,25			
0,807	14-мер	0,28			
0,831	15-мер	0,43	0,41	0,46	0,33
0,869	16-мер	0,32	0,29	0,45	0,22
0,911	17-мер	0,5	0,47	0,41	0,22
0,915	18-мер	0,62	0,56	0,47	0,39
0,937	19-мер	0,6	0,59	0,5	0,27
0,956	20-мер	1,29	0,95	0,75	0,45
0,963	21-мер PO	0,37		0,23	
0,972	21-мер	0,78	0,6	0,58	0,42
0,979		0,4	0,3		
0,984					
0,986	PS на PO и N-1	1,38	1,86	1,22	1,01
0,993	PS на PO	6,78	6,56	5,39	4,58
0,995	относительно PS на PO		2,63		
1	FLP	74,91	77,42	80,67	83,96
1,006		0,56	0,6	2,08	
1,008		0,6	1,46		2,49
1,01					
1,013		1,96			
1,016					
1,023	Плюс 14,02 Да**	2,680	2,39	2,79	3,04
1,03	изобутерилены*	0,25			
1,04	изобутерилены*	0,26			
1,05	изобутерилены*				
1,07	изобутерилены*	0,26			
1,1	изобутерилены*	0,29			
1,13		0,22			
1,14					

	общий % площади показанных пиков (не показаны пики <0,2%)	97,32	98,76	98,6	97,38
	общий % площади до главного	15,33	16,89	13,06	7,89
	общий % площади после главного	6,52	3,85	2,79	5,53
	Пики, связанные с заменой PS на PO, отн. время удерживания 0,986, 0,989, 0,993, 0,995	8,160	11,050	6,610	5,590

\* изобутерилы означают неполное C/D

\*\* Плюс 14,02 Да представлял собой примесь, обусловленную миграцией метила, связанного с исходным материалом, амидитом MeMOP, который мигрирует в один из амидитов fU.

5

Процентные площади пиков, идентифицированных в области относительного времени удерживания 0,979-0,984 и в области относительного времени удерживания 1,006-1,016, указанные в таблице, могут навести на мысль о различиях между синтезаторами, но хроматограммы показывают, что ни один из них в действительности не является отдельным пиком в указанных областях. Например, присутствуют пики, идентифицированные при относительном времени удерживания 0,979 для примеров, полученных в АКТА, которых нет в примерах, полученных в реакторе с псевдооживленным слоем. Аналогично, присутствуют пики, идентифицированные при относительном времени удерживания 0,984 для примеров, полученных в реакторе с псевдооживленным слоем, которых нет в примерах, полученных в АКТА. Однако при изучении хроматограмм на фиг. 17 установлено, что они представляют собой подобные крайние левые плечи основного пика, а записанное время пиков просто зависит от того, где были проведены линии при автоматическом интегрировании. Точно так же существует повышенная область выше базовой линии между относительным временем удерживания 1,006 и относительным временем удерживания 1,016, которая строится различным образом в зависимости от того, где проведены линии при автоматическом интегрировании, но аналогичная область повышенной базовой линии присутствует во всех образцах. Представленная таблица может навести на мысль, что присутствуют пики при относительном времени удерживания 1,006 в образцах, полученных на АКТА, которые отсутствуют в образцах, полученных в реакторе

10

15

20

с псевдооживленным слоем, и что присутствуют пики при относительном времени удерживания 1,01 в образцах, полученных в реакторе с псевдооживленным слоем, которые отсутствуют в образцах, полученных на АКТА, но хроматограмма на фиг. 17 свидетельствует о том, что в действительности в указанных областях относительного времени удерживания нет существенных различий между образцами, полученными в разных синтезаторах.

Таблица 18. Автоматизированные процессы на схеме 314

**Типичный перечень автоматизированных стадий:**

- 1) КИСЛОТА (выполнение реакции детритилирования)
- 2) Промывка типа DCA (промывка линия подачи кислоты/DCA)
- 3) Промывка типа Реактор (промывка реактора)
- 4) Промывка типа Амидит (промывка зоны смешения амидита/активатора)
- 5) Очистка CPL (очистка от амидита и активатора)
- 6) CPL (реакция сочетания)
- 7) Промывка типа Амидит (промывка зоны смешения амидита/активатора)
- 8) Промывка типа Реактор (промывка реактора)
- 9) Окисление или сульфирование (выполнение реакции окисления или сульфирования)
- 10) Промывка типа I2 или Сульф. в зависимости от стадии 9) (промывка линии подачи окислителя или сульфорирующего реагента)
- 11) Промывка типа Реактор (промывка реактора)
- 12) КЭП (выполнение реакции кэпирования)
- 13) Промывка типа КЭП (промывка линий подачи КэпА и КэпВ)
- 14) Промывка типа Реактор (промывка реактора)

**Название стадии: КИСЛОТА**

Назначение: выполнение реакции детритилирования.

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7205-B на 2 секунды, закрыть V7205-B
- Открыть V7205-A, открыть V7204-B
- Считать значения кислотного баланса, баланса отходов
- Включить насос 5 со скоростью входящего потока на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА: ОБ1.
- Закрыть V7205-A, открыть V7205-B
- Включить насос 5 на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для очистки канала подачи кислоты

- Закрыть V7204-B, V7205-B.
- Закрыть V701-D. Открыть V701-A. Выполнить псевдоожиг такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом:
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7205-B на 2 секунды, затем закрыть V7205-B.
- Открыть V7205-A, открыть V7204-B
- Начать отсчет времени по таймеру для определения ВРЕМЕНИ ЗАДЕРЖКИ НА ВХОДЕ и одновременно включить насос 5 со СКОРОСТЬЮ ВХОДЯЩЕГО ПОТОКА на время, определенное СКОРОСТЬЮ ВХОДЯЩЕГО ПОТОКА для насоса 5 и входящим объемом, ОБ2, для количества кислоты.
- После выключения таймера закрыть V701-D, открыть V701-B, открыть V701-F и включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ.
- После загрузки объема кислоты ОБ2 закрыть V7205-A, открыть V7205-B, продолжать работу насоса 5 в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ для очистки канала подачи кислоты
- Закрыть V7204-B, V7205-B. Открыть V701-E.
- Закрыть V701-F, V701-B
- Подождать, когда  $PT1 < \text{ДАВЛЕНИЕ НА ВХОДЕ}$ , чтобы закрыть V701-A, V701-E.

**Название стадии: промывка типа DCA**

Назначение: промывка ACN линии подачи кислоты

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7205-C, открыть V7204-B
- Включить насос 5 со скоростью входящего потока на время, рассчитанное на основании входящего объема
- Закрыть V7205-C, открыть V7205-B
- Включить насос 5 на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для очистки канала подачи кислоты
- Закрыть V7204-B, V7205-B.
- Открыть V701-C, включить насос ACN P6 со СКОРОСТЬЮ ВХОДЯЩЕГО ПОТОКА на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА

- Закрывать V701-C. Закрывать V701-D. Открыть V701-A. Выполнить псевдоожижение такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом:
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- Если параметр WP ВРЕМЯ > 0, открыть V-701B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- Закрывать V701-F, открыть V701-E
- держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- закрыть V701-B и подождать, когда  $PT1 < \text{ДАВЛЕНИЕ НА ВХОДЕ}$
- закрыть V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

**Название стадии: ПРОМЫВКА типа Реактор**

Назначение: непосредственное промывание реактора

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V701-C, включить насос АСН Р6 со СКОРОСТЬЮ ВХОДЯЩЕГО ПОТОКА на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА
- Закрывать V701-C, открыть V701-A, закрыть V701-D. Выполнить псевдоожижение такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- Если параметр WP ВРЕМЯ > 0, открыть V701-B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- Закрывать V701-F. Открыть V701-E.
- держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- закрыть V701-B и подождать, когда  $PT1 < \text{ДАВЛЕНИЕ НА ВХОДЕ}$
- закрыть V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

**Название стадии: очистка CPL исходного АМ-х (x = 1, 2, ..., 8)**

Назначение: прокачивание раствора амидита в отходы (необязательно, обычно расходуется 0,5 мл раствора амидита на каждое прокачивание, применяется только в масштабе 50 мкмоль для решения проблемы проникновения влаги через PFA трубки).

- Направить V710-A в отходы

- Открыть V710-D для вентиляции зоны амидита/активатора.
- Открыть V710x-B на 2 секунды, закрыть V710x-B.
- Открыть V710x-A, открыть V710x<sub>2</sub>-B и V710x<sub>3</sub>-B, где x, x<sub>2</sub> и x<sub>3</sub> относятся к одному и тому же насосу.
- Включить насос у со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА
- закрыть V710x-A, открыть V710x-B, продолжить работу насоса у в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ.
- Открыть V7110-B на 2 секунды, закрыть V7110-B.
- Открыть V7110-A, открыть V7107-B и V7108-B.
- Включить насос у со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА
- закрыть V7110-A, открыть V7110-B, продолжить работу насоса у в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- Закрыть V710-D, открыть V710-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ. Закрыть V710-B.

**Название стадии: CPL с исходным AM-x (x = 1, 2, ..., 8)**

Назначение: загрузка амидита и активатора для проведения реакции CPL и промывки

- Направить V710-A в реактор
- Открыть V710-D для вентиляции зоны амидита/активатора.
- Открыть V710x-B на 2 секунды, закрыть V710x-B.
- Открыть V710x-A, открыть V710x<sub>2</sub>-B и V710x<sub>3</sub>-B, где x, x<sub>2</sub> и x<sub>3</sub> относятся к одному и тому же насосу.
- Включить насос у со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА
- закрыть V710x-A, открыть V710x-B, продолжить работу насоса у в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ.
- Открыть V7110-B на 2 секунды, закрыть V7110-B.
- Открыть V7110-A, открыть V7107-B и V7108-B.
- Включить насос у со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА
- закрыть V7110-A, открыть V7110-B, продолжить работу насоса у в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- Закрыть V710-D, открыть V710-A, V701-D
- Открыть V710-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ.

- Закрыть V710-B, V710-A и V701-D.
- Открыть V701-A. Повторить псевдоожигение в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ.
- закрыть V701-B и подождать, когда  $PT1 < \text{ДАВЛЕНИЕ НА ВХОДЕ}$ .
- закрыть V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

**Название стадии: промывка типа АМх (x = 1, 2, ..., 8)**

Назначение: промывка амидитной зоны

- Открыть V710-D для вентиляции зоны амидита/активатора.
- Открыть V710x-C для x=1, 2, ... 10
- Включить насос 1, насос 2 и насос 3 со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на ВРЕМЯ ПОДАЧИ
- Закрыть V710x-C для x=1, 2, ... 10
- Открыть V710x-B для x=1, 2, ... 10
- Включить насос 1, насос 2 и насос 3 со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на ВРЕМЯ ПОДАЧИ
- Открыть V710-C, включить насос АСН Р6 со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для промывания стенок зоны АМД/АСТ
- Закрыть V710-C
- Закрыть V710-D, направить V710-A в реактор, открыть V701-D
- Открыть V710-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ
- Направить V710-A в отходы, закрыть V701-D, открыть V701-A. Выполнить псевдоожигение такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
  - Если параметр WP ВРЕМЯ > 0, открыть V701-B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ

- закрыть V701-B и подождать, когда  $PT1 < \text{значение, введенное пользователем}$
- закрыть V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

### **Название стадии: Окисление**

Назначение: проведение реакции окисления

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7203-B на 2 секунды, закрыть V7203-B
- Открыть V7203-A, открыть V7201-B и V7202-B.
- Включить насос 4 со скоростью входящего потока на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА ОБ1
- Закрыть V7203-A, открыть V7203-B
- Включить насос 4 на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для очистки трубок
- Закрыть V7201-B, V7202-B, V7203B
- Закрыть V701-D. Открыть V701-A. Выполнить псевдоожиг такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- Если параметр  $WP \text{ ВРЕМЯ} > 0$ , открыть V701-B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- Закрыть V701-F. Открыть V701-E.
- держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- закрыть V701-B и подождать, когда  $PT1 < \text{ДАВЛЕНИЕ НА ВХОДЕ}$
- закрыть V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

### **Название стадии: промывка типа I2**

Назначение: выполнение промывки после окисления

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7203-B на 2 секунды, закрыть V7203-B
- Открыть V7203-C, открыть V7201-B и V7202-B
- Включить насос 4 со скоростью входящего потока на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА ОБ1
- Закрыть V7203-C, открыть V7203-B
- Включить насос 4 на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для очистки трубок
- Закрыть V7201-B, V7202-B, V7203B
- Открыть V701-C

- Включить насос АСН Р6 со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА, для промывки стенок реактора.
- Закрыть V701-C.
- Закрыть V701-D. Открыть V701-A. Выполнить псевдоожигение такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- Если параметр WP ВРЕМЯ > 0, открыть V701-B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- Закрыть V701-F. Открыть V701-E.
- держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- закрыть V701-B и подождать, когда PT1 < ДАВЛЕНИЕ НА ВХОДЕ
- закрыть V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

**Название стадии: СУЛЬФ.**

Назначение: выполнение реакции сульфирования

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7204-B на 2 секунды, закрыть V7204-B
- Открыть V7204-A, открыть V7205-B
- Включить насос 5 со скоростью входящего потока на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА ОБ1
- Закрыть V7204-A, открыть V7204-B
- Включить насос 5 на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для очистки трубок
- Закрыть V7204-B, V7205-B.
- Закрыть V701-D. Открыть V701-A. Выполнить псевдоожигение такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- Если параметр WP ВРЕМЯ > 0, открыть V701-B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- Закрыть V701-F. Открыть V701-E
- Держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- Закрыть V701-B и подождать, когда PT1 < значение, введенное пользователем

- Закрывать V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

**Название стадии: промывание типа СУЛЬФ.**

Назначение: выполнение промывки после сульфирования

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7204-B на 2 секунды, закрыть V7204-B
- Открыть V7204-C, открыть V7205-B
- Включить насос 5 со скоростью входящего потока на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА ОБ1
- Закрывать V7204-C, открыть V7204-B
- Включить насос 5 на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для очистки трубок
- Закрывать V7204-B, V7205-B.
- Открыть V701-C
- Включить насос АСН Р6 со СКОРОСТЬЮ ВХОДЯЩЕГО ПОТОКА на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА
- Закрывать V701-C.
- Закрывать V701-D. Открыть V701-A. Выполнить псевдооживление такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- Если параметр WP ВРЕМЯ > 0, открыть V701-B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- Закрывать V701-F. Открыть V701-E
- Держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- Закрывать V701-B и подождать, когда РТ1 < значение, введенное пользователем
- Закрывать V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

**Название стадии: КЭП**

Назначение: выполнение реакции кэпирования

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7201-B, V7202-B на 2 сек.
- Закрывать V7201-B, V7202-B
- Открыть V7201-A, V7202-A, V7203-B
- Включить насос 4 со скоростью входящего потока на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА ОБ1

- Закрыть V7201-A, V7202-A. Открыть V7201-B, V7202-B.
- Включить насос 4 на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для очистки трубок
- Закрыть V7201-B, V7202-B, V7203B
- Закрыть V1-D. Открыть V701-A. Выполнить псевдоожигание такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.
- Если параметр WP ВРЕМЯ > 0, открыть V701-B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- Закрыть V701-F. Открыть V701-E
- держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- закрыть V701-B и подождать, когда PT1 < ДАВЛЕНИЕ НА ВХОДЕ
- закрыть V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

#### **Название стадии: промывка типа КЭП**

Назначение: выполнение промывки после кэпирования

- Открыть V701-D для вентиляции реактора
- Открыть V7201-B, V7202-B на 2 сек.
- Закрыть V7201-B, V7202-B
- Открыть V7201-C, V7202-C, V7203-B
- Включить насос 4 со СКОРОСТЬЮ ВХОДЯЩЕГО ПОТОКА на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА ОБ1
- Закрыть V7201-C, V7202-C. Открыть V7201-B, V7202-B.
- Включить насос 4 на ВРЕМЯ ПОДАЧИ для очистки трубок
- Закрыть V7201-B, V7202-B, V7203B
- Открыть V701-C
- Включить насос АСН Р6 со СКОРОСТЬЮ ВХОДЯЩЕГО ПОТОКА на время, рассчитанное на основании ВХОДЯЩЕГО ОБЪЕМА
- Закрыть V701-C.
- Закрыть V701-D. Открыть V701-A. Выполнить псевдоожигание такое количество раз, которое равно КОЛИЧЕСТВУ ЗАГРУЗОК, следующим образом
  - Открыть V701-B на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-B.
  - Открыть V701-G, V701-D на ВРЕМЯ ПОДАЧИ, затем закрыть V701-D, V701-G.

- Если параметр WP ВРЕМЯ > 0, открыть V701-B, V701-F, включить сливной насос со СКОРОСТЬЮ ПОДАЧИ на все ВРЕМЯ ПОДАЧИ.
- Закрыть V701-F. Открыть V701-E.
- держать открытыми V701-B, V701-A, V701-E в течение ВРЕМЕНИ ПОДАЧИ
- закрыть V701-B и подождать, когда PT1 < ДАВЛЕНИЕ НА ВХОДЕ
- закрыть V701-A и V701-E и завершить эту стадию.

**Пример 7. Антисмысловая нить ANGPTL3 в масштабе 100 мкмоль, с интеграцией реагента DCA из одного цикла в другой**

Получали такую же антисмысловую нить ANGPTL3, представленную на фиг. 10, с использованием способа с псевдооживленным слоем по настоящему изобретению, и он включал стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и кэпирования для последовательного введения фосфорамидитов. В примере 7 продемонстрировано наименьшее количество реагента DCA среди всех примеров. Кэпирование не требуется после присоединения фосфорамидита MeMOP в 21 цикле. В данном примере использовали меньшее количество эквивалентов DCA по сравнению с примерами 1, 2, 3, 4 и 6. В таблице 31 представлено руководство по различным вариантам реализации в примерах реакторов с псевдооживленным слоем. Одним из факторов, способствующих уменьшению количества DCA, является то, что в каждом фосфорамидитном цикле повторно использовали более чистую часть кислотных стоков из предыдущего фосфорамидитного цикла. Повторно используемая кислота выполняет часть деблокирования. Кроме того, что, возможно, более важно, повторно используемая кислота вымывает остаточный ACN в/на смоченных гранулах с конца предыдущего цикла и обеспечивает набухание гранул смолы при псевдооживлении. Известно, что ACN препятствует деблокированию DCA. В предыдущих вариантах реализации осуществляли начальное псевдооживление смолы и вытеснение ACN свежим раствором DCA. Идея заключается в том, чтобы вместо этого повторно использовать кислоту во избежание необходимости использования свежей кислоты на данной технологической стадии. Повторно используемая кислота не содержит ацетонитрил, потому что она представляет собой более чистую часть кислотных стоков предыдущего фосфорамидитного цикла. Набухание гранул смолы во время первоначального псевдооживления уменьшает последующее падение давления во время последующей фазы деблокирования в нисходящем потоке, поскольку это обеспечивает возможность набухания и расширения слоя смолы во время псевдооживления. Максимальный перепад давления через слой смолы во время эксперимента составлял 15 фунт/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.), поскольку это было давление подачи азота,

используемого для прокачивания жидкости через слой смолы. Еще одно отличие по сравнению с предыдущими примерами заключается в уменьшении объема растворов для экипирования, который был уменьшен на 50% до 1,75 мл каждого из экипирующих растворов А и В, а третье отличие заключается в устранении большого количества промывок псевдооживленного слоя между реакциями. Для способа, осуществленного в данном примере, использовали 29,2% стандартного количества кислоты, которое обычно необходимо для Cytiva АКТА (мл кислоты/ммоль исходной смолы). Установка аппарата синтезатора для повторного использования кислоты показана на фиг. 8.

Повторное использование кислоты осуществляли с помощью отдельной питающей емкости и насоса для повторно используемой кислоты. Каждый цикл введения фосфорамидита включал 2 стадии кислотного деблокирования. Для первой кислотной стадии каждого цикла кислоту загружали в реактор из питающей емкости для повторно используемой кислоты. Ее прокачивали через слой смолы быстрее, поскольку основной причиной ее использования является набухание слоя при псевдооживлении, а затем вытеснение ACN из слоя. На выходе из реактора кислоту после первой кислотной стадии перекачивали в отходы. На второй стадии подачи кислоты загружали свежую кислоту из питающей емкости свежей кислоты. После выхода из реактора кислоту со второй кислотной стадии перекачивали обратно в питающую емкость для повторно используемой кислоты с целью повторного использования в следующем цикле. Для первого цикла последовательности питающую емкость для повторно используемой кислоты наполняли достаточным количеством свежей кислоты для использования на первой стадии кислотной обработки. На всех последующих стадиях повторно использовали кислоту из предыдущего цикла, которая находилась в питающей емкости для повторно используемой кислоты. Параметры перекачивания устанавливали таким образом, чтобы вся повторно используемая кислота из предыдущего цикла была загружена в реактор. Опорожнение емкости повторного использования каждый раз ограничивает перенос только одним циклом и предотвращает накопление в емкости повторно используемой кислоты.

Процесс в данном примере выполняли в масштабе 100 мкмоль, при этом высота слоя смолы, смоченной растворителем ACN, достигала 11 см в начале последнего цикла. Максимальная высота слоя смолы 12 см была достигнута во время нисходящей фазы на последней стадии деблокирования. Максимальный перепад давления на слое смолы во время эксперимента составлял 15 фунтов/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.). Реактор имел нижнюю секцию диаметром 0,63 см и высотой 23 см и верхнюю секцию с коническим дном диаметром 4,7 см и высотой 25 см. Растворы реагентов получали так же, как описано в примере 6 (концентрация гидрида ксантана составляла 0,2 М). Заполняли все насосы и

линии подачи. Вставляли сухую набивку во флакон с ACN и во все шприцы. Для амидитов и активатора использовали шприцевые насосы, а для подачи всех других реагентов и растворителей использовали перистальтические насосы и емкости для подачи.

Начинали с mU, связанного известными способами со смолой NittoPhase HL 2' OMeG(ibu) 250, партия H08023 (далее упоминаемого как «mU-смола»). Общие условия синтеза приведены в таблице 19.

Таблица 19. Условия синтеза и концентрации реагентов для примера 7.

Элемент	Значение	Единицы
Загрузка смолы	249	мкмоль/г
Исходное количество смолы	403,3	мг
Масштаб синтеза	100,42	мкмоль/г
Повторное использование деблокирующего раствора из предыдущего цикла за один цикл	7-18	мл
Время деблокирования с повторным использованием кислоты *	1,83-2,67	мин
Количество свежего деблокирующего раствора за цикл	7-18	мл
Время реакции деблокирования с использованием свежей кислоты *	5,17-8,33	мин
Концентрация амидита	0,1	М в ACN
Количество эквивалентов амидита	2	экв.
Концентрация активатора	0,5	М в ACN
Количество эквивалентов активатора	10	экв.
Количество раствора амидита за цикл	2	мл
Количество раствора активатора за цикл	2	мл
Время реакции сочетания	10-15	мин
Количество эквивалентов йода	2,1 первые два цикла окисления, 2,65 все остальные	экв.
Количество окислительного раствора за цикл *	4,2, 5,3	мл
Время окисления	6,7-7	мин
Количество эквивалентов сульфорирующего реагента	13	экв.
Количество сульфорирующего раствора за цикл	6,5	мл
Время сульфирования *	12-13	мин
Количество кэпирующего раствора А за цикл	1,75	мл
Количество кэпирующего раствора В за цикл	1,75	мл
Время кэпирования *	3,8-4	мин

\* представляет собой общее время от момента первого контакта реагентов со смолой до момента приведения в контакт первой промывки ACN со слоем смолы.

Конечная масса олигонуклеотида, связанного со смолой, составляла 1,220 г в высушенном виде. Это соответствует увеличению массы на 0,817 г или 8,13 г/ммоль. Выполняли реакцию отщепления и снятия защиты с концентрированным раствором NH<sub>4</sub>OH при 55 °С в течение 5 часов. По данным СВЭЖХ, отщепленный олигонуклеотидный продукт, лишенный защиты, имеет чистоту 79,92% по проценту площади пика, как показано в таблице результатов СВЭЖХ для примеров с 6 по 9.

Далее будет описан способ применения устройства, показанного на фиг. 8. Для каждого фосфорамидита, добавленного в синтез, последовательно выполняли стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования, если в последовательности присутствует связь P=S) и кэпирования, как описано ниже. Если в процедуре указано, что жидкость прокачивают вниз через слой смолы, это означает, что сливной насос на выходе из нижней части реактора работает с установленным заданным значением, в то время как давление азота давит на верхнюю часть слоя смолы, продавливая жидкость вниз. Перистальтический насос предназначен для измерения расхода жидкости через слой с регулируемой скоростью.

**Реакция деблокирования:** Процесс деблокирования включал стадии повторного использования деблокирующего раствора и свежего деблокирующего раствора. Значения объемов и времени, которые увеличивались в зависимости от длины олигонуклеотида, представлены в таблице 20.

Таблица 20. Увеличение объема раствора DCA и времени контакта при деблокировании в режиме поршневого потока от начала до конца синтеза в примере 7.

цикл	амидит	Объем свежего раствора DCA (мл)	время контакта с DCA в режиме поршневого потока (секунды)
1	MGS	7	310
2	MAS	7	320
3	MG	8	320
4	MU	8	340
5	MU	9	340
6	MU	9	340
7	MU	10	360
8	FA	10	360
9	MC	11	380
10	MC	11	380
11	MU	12	400
12	FU	12	400
13	MC	13	420
14	MC	13	420
15	FA	14	440
16	MA	15	440
17	FU	16	460
18	FA	17	460
19	FUS	17	480
20	FGS	18	480
21	MEMOPS	18	500

- 5 Повторное использование деблокирующего раствора: повернуть вентиль 808 в положение А, вентиль 807 в положение В и закрыть вентиль 824. Загрузить исходный объем повторно используемого деблокирующего раствора (5 мл для циклов 1-3, 6 мл для циклов 4-9, 7 мл для циклов 10-21) в зону подачи кислоты, затем прокачать его в реактор под давлением азота в течение 6 секунд. Объем повторно используемого деблокирующего раствора в
- 10 каждом цикле соответствует объему свежего деблокирующего раствора в предыдущем цикле. Открыть вентиль 824. Сливные вентили для отходов (вентили 809 и 810 на фиг. 8) закрыты. Сбросить давление в верхней части реактора в течение 15 секунд, одновременно открывая вентиль 38, вызывая барботаж азота, обеспечивающий перемешивание и псевдооживление слоя смолы с растворами реагентов. Закрыть вентиляционный вентиль
- 15 854 и вентиль 838 и открыть вентиль 844 для прокачивания под давлением азота в течение 3 секунд. Закрыть вентиль 844 и повторить стадии псевдооживления еще 4 раза. Большая часть набухания смолы происходит во время псевдооживления. Открыть сливной вентиль (вентиль 810) и прокачать деблокирующий раствор через слой смолы с помощью насоса 9

со скоростью 10 мл в минуту. Насос 9 служит в качестве дозирующего устройства для настройки скорости на выходе, в то время как давление азота в верхней части реактора создает движущую силу для стекания жидкости вниз и из нижней части реактора. Параллельно с работой насоса 9 открыть вентиль 837 и включить насос 10, подавая повторно используемый деблокирующий раствор со скоростью 30 мл/мин до тех пор, пока не будет перекачан второй объем 2–11 мл (в зависимости от цикла) (насос 10 заканчивает работу раньше насоса 9). Жидкость, перекачиваемая в зону подачи кислоты из насоса 10, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания потока в течение всего времени работы насоса 9. Насос 9 работает непрерывно в течение 110-160 секунд (увеличение на протяжении всего эксперимента), чтобы в трубке между реактором и вентилем 839 гарантированно не осталось повторно используемой кислоты. Это обеспечивает очистку сливной трубки до перекачивания свежей кислоты через колонку и обратно в емкость для повторно используемой кислоты на последующей стадии деблокирования с использованием свежей кислоты.

Деблокирование свежим раствором: повернуть вентиль 808 в положение А, вентиль 807 в положение В и закрыть вентиль 824. Загрузить 5-7 мл свежего деблокирующего раствора в зону подачи кислоты, затем прокачать его в реактор под давлением азота в течение 6 секунд. Открыть вентиль 824. Сливные вентили для отходов (вентили 809 и 810) закрыты. Открыть вентиль для отходов (вентиль 810) и прокачать деблокирующий раствор через слой смолы с помощью насоса 9 со скоростью 4 мл/мин. Параллельно с работой насоса 9 открыть вентиль 814 и включить насос 1, подавая деблокирующий раствор со скоростью 30 мл/мин, пока не будет перекачено 2–11 мл (насос 1 заканчивает работу раньше насоса 9). Жидкость, перекачиваемая в зону подачи кислоты из насоса 1, одновременно поступает в реактор для поддержания уровня жидкости над слоем смолы и поддержания потока в течение всего времени работы насоса 9. Используют дополнительное время перекачивания для очистки всех линий от реактора к питающей емкости для повторно используемой кислоты, чтобы весь объем свежей кислоты можно было использовать на следующей стадии повторного использования кислоты следующего цикла.

Выполнить следующую процедуру промывки ACN 4 раза. Открыть вентиль 809 отходов, загрузить ACN (4 мл) в зону подачи, затем закрыть вентиль 809 и обеспечить принудительное движение жидкости в реактор под давлением азота в течение 2 секунд. Открыть вентиль отходов (вентиль 810) и прокачать промывочный ACN через слой смолы с помощью насоса 9 со скоростью 10 мл в минуту, пока промывочный раствор не пройдет

через смолу. В этом заключается значительное уменьшение количества промывочного растворителя ACN по сравнению с примерами 1, 2 и 4, в которых использовали такой же синтезатор. Дополнительные промывки в псевдооживленном слое между стадиями промывки в режиме поршневого потока включали только во время первого цикла.

5

**Реакция сочетания:** После промывки после деблокирования связывали следующий по последовательности фосфорамидит, который вводили с использованием последовательных стадий в направлении от 3' к 5'. Для каждого фосфорамидита, присоединяемого в последовательности, реакцию сочетания осуществляли по существу таким образом, как описано ниже, используя раствор амидита, соответствующий нуклеотиду в последовательности. Повернуть вентиль 808 в положение В. Дважды предварительно промыть зону подачи амидита и канал подачи в реактор, каждый раз закачивая 4 мл ACN в зону подачи амидита при закрытом вентиле 809, затем открыть вентиль 810 и откачивать в течение 15 секунд при скорости 10 мл/мин. Закачать сначала раствор активатора (2 мл, 10 экв., таблица 1), а затем соответствующий раствор амидита (2 мл, 2,0 экв.) в зону подачи. Закрыть вентиль 809 и открыть вентили 855, 824 и 838 на 3 секунды, чтобы смешать раствор амидита и активатора с барботирующим азотом. Закрыть вентили 855, 824 и 838. Прокачать смесь из зоны подачи в реактор под давлением азота в течение 6 секунд, открывая вентиль 845, затем открыть вентиль 824 и продолжить прокачивание под давлением азота в течение 8 секунд. С помощью растворов амидита и активатора, смешанных со смолой, выполнить непрерывное псевдооживление слоя следующим образом: при открытом вентиле 824 и закрытом вентиле 809 закачать азот под давлением в верхнюю часть реактора в течение 3 секунд. Сбросить давление в верхней части реактора в течение 15 секунд, одновременно открывая вентиль 838, вызывая барботаж азота, обеспечивающий перемешивание и псевдооживление слоя смолы с растворами реагентов. Непрерывно повторять описанный процесс в течение 10 минут (15 минут для фторамидитов и mA в цикле 16), затем открыть вентиль 809 и обеспечить давление азота на 8 секунд в верхней части реактора, сливая жидкость со дна реактора в отходы. Закачать ACN (4 мл) в зону подачи амидита и прокачать его через реактор под давлением азота в течение 15 секунд. Повторить описанную промывку один раз. В этом заключается значительное уменьшение количества промывочного растворителя ACN по сравнению с примерами 1, 2 и 4, в которых использовали такой же синтезатор. Кроме того, в версии реактора большего размера (примеры 8, 9 и 10) используют спрейбол и еще меньшее количество ACN, в мл/ммоль.

**Реакция окисления** (если требуется вместо сульфирования): после промывки после реакции сочетания проводили реакцию окисления, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентили 806, 807 и 808 в положение А и открыть вентили 824, 809 и 853. Закачать раствор окислителя (Таблица 9, 4,2 мл для циклов 3 и 4, 5,3 мл для циклов 5-18) в зону подачи, закрыть вентиль 809 и прокачать раствор йода в реактор под давлением азота в течение 10 секунд. Выполнить псевдооживление слоя в реакторе 11 раз следующим образом: закачать азот под давлением в верхней части реактора в течение 5 секунд. Сбросить давление в верхней части реактора в течение 15 секунд, одновременно открывая вентиль 838, вызывая барботаж азота, обеспечивающий перемешивание и псевдооживление слоя смолы с раствором реагента. Открыть вентиль 810 и откачать 5,3 мл жидкости с помощью насоса 9 в течение 30 секунд, затем закрыть вентиль 810. Открыть вентиль 843 и вентиль 809 для выкачивания оставшегося реагента из реактора. Закрыть вентиль 843 и открыть вентиль 853.

15 Выполнить следующую процедуру промывки АСN 4 раза. В этом заключается значительное уменьшение количества промывочного растворителя АСN по сравнению с примерами 1, 2 и 4, в которых использовали такой же синтезатор. Открыть сливной вентиль 809, загрузить АСN (4 мл) в зону подачи йода, затем закрыть вентиль 809 и прокачать его в реактор под давлением азота в течение 2 секунд. Открыть вентиль отходов (вентиль 810) и прокачать промывочный АСN через слой смолы с помощью насоса 9 со скоростью 10 мл в минуту, пока промывочный раствор не пройдет через смолу.

**Реакция сульфирования (тиолирования)** (если требуется вместо окисления): после промывки после реакции сочетания проводили реакцию тиолирования, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентиль 806 в положение В, вентили 805, 807 и 808 в положение А и открыть вентили 824 и 809. Закачать сульфлирующий раствор (Таблица 9, 6,5 мл) в зону подачи, закрыть вентиль 809 и прокачать его в реактор под давлением азота в течение 6 секунд. Выполнить псевдооживление слоя реактора 22 раза следующим образом: закачать азот под давлением в верхней части реактора в течение 3 секунд. Сбросить давление в верхней части реактора в течение 15 секунд, одновременно открывая вентиль 838, вызывая барботаж азота, обеспечивающий перемешивание и псевдооживление слоя смолы с растворами реагентов. Открыть вентиль 810 и откачать 6,5 мл объема жидкости насосом 9 в течение 30 секунд, затем закрыть вентиль 810. Промывку выполняют так, как описано выше для реакции окисления, но АСN подают в реактор через зону подачи сульфлирующего раствора.

**Реакция кэпирования:** после промывки после реакции окисления (или сульфирования) проводили реакцию кэпирования, по существу так, как описано ниже. Повернуть вентили 805 и 806 в положение В, а вентили 807 и 808 в положение А. Открыть вентили 824 и 809.

- 5 Одновременно закачать кэпирующий раствор А и кэпирующий раствор В, по 1,75 мл каждого, в зону подачи, а затем закрыть вентиль 809. Закачать жидкость в реактор под давлением азота в течение 6 секунд. Выполнить псевдооживление слоя реактора 3 раза следующим образом: обеспечивать давление азота в верхней части реактора в течение 5 секунд. Сбросить давление в верхней части реактора в течение 15 секунд, одновременно
- 10 открывая вентиль 838, вызывая барботажа азота, обеспечивающий перемешивание и псевдооживление слоя смолы с растворами реагентов. Открыть вентиль 810 и откачать 3,5 мл объема жидкости насосом 9 в течение 35 секунд, затем закрыть вентиль 810. Промывку выполняют так, как описано выше для реакции окисления, но АСN подают в реактор через зону подачи кэпирующего раствора.

- 15
- Выполнить следующую процедуру промывки АСN 1 раз. Открыть сливной вентиль 809, загрузить АСN (4 мл) в зону подачи кэпирующего раствора, затем закрыть вентиль 809 и прокачать растворитель в реактор под давлением азота в течение 2 секунд. Открыть сливной вентиль (вентиль 810) и прокачать промывочный АСN через слой смолы с
- 20 помощью насоса 9 со скоростью 3 мл в минуту, пока промывочный раствор не пройдет через смолу.

- В самом последнем цикле используют стадию сульфирования, а затем промывку АСN. После этого промыть смолу раствором ДЭА (20% об./об. в АСN) в течение 10 минут.
- 25 Установить вентиль 808 в открытое положение (В) и открыть вентили 815 и 824. Загрузить 9,3 мл ДЭА в зону подачи с помощью насоса 4. Выполнить псевдооживление 4 раза, затем открыть вентиль 810 и включить насос 9 на 60 секунд, перекачивая ДЭА в отходы со скоростью 8 мл в минуту. Повторить описанные стадии еще 3 раза, чтобы сделать в общей сложности четыре промывки ДЭА. Промыть 3 раза по 4 мл АСN, пропуская его через зону
- 30 подачи амидита, а затем выполнить 2 промывки в псевдооживленном слое, используя 12 мл АСN.

Высота слоя смолы на протяжении всего эксперимента была такой, как показано в таблице 21.

Таблица 21. Высота слоя смолы увеличивается от начала к концу синтеза в примере 7.

цикл	амидит	Высота слоя смолы, смоченной ACN, в начале цикла (см)	Высота слоя смолы, смоченной толуолом, после деблокирования (см)
1	MGS	4,3	7,1
2	MAS	5,1	7,7
3	MG	5,9	7,9
4	MU	6,3	8,1
5	MU	6,9	8,2
6	MU	6,8	8,4
7	MU	7,2	8,7
8	FA	7,4	8,9
9	MC	8	9,1
10	MC	8,1	9,5
11	MU	8,6	9,9
12	FU	8,9	9,9
13	MC	9	10
14	MC	9,3	10,1
15	FA	9,7	10,5
16	MA	10	10,9
17	FU	9,9	11,1
18	FA	10,2	11,4
19	FUS	10,8	11,7
20	FGS	11	11,9
21	MEMOPS	11	12

- Сушили азотом, пропуская его вниз через слой смолы, в течение 120 минут. Конечная масса составила 1,220 г сухой смолы. Это соответствует увеличению массы на 0,817 г или 8,13 г/ммоль. Значение OD/ммоль указано в таблице 17. Отщепление и снятие защиты проводили на образце высушенной смолы с олигонуклеотидом массой 22,8 мг. Для этого смолу помещали во флакон для СВЭЖХ с 0,5 мл гидроксида аммония. Флакон устанавливали на шейкер для отщепления и снятия защиты (при 55°C в течение 5 часов).
- По истечении отведенного времени флакон вынимали и давали остыть до комнатной температуры. Образец помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл с фильтрующей корзиной и центрифугировали от 30 секунд до 1 минуты. В другой флакон для СВЭЖХ помещали 1,5 мл воды Milli Q и добавляли 50 мкл жидкости образца (содержащей олигонуклеотид). Отработанную смолу убирали в отходы. Несколько раз переворачивали пробирку для СВЭЖХ для перемешивания образца, затем помещали в прибор для СВЭЖХ. По данным СВЭЖХ, отщепленный олигонуклеотидный продукт, лишенный защиты, имеет чистоту 79,92% по проценту площади пика, как показано в таблице 17, где представлены результаты СВЭЖХ для примеров с 6 по 10 и их сравнение с

Cytiva АКТА. Анализ ЖХМС подтверждает, что пик основного продукта соответствует правильной цепи. Наблюдали только одно значительное усечение (>1% площади), пик площадью 2,02%, соответствующий неполному сочетанию последнего амидита MeMOP. Благодаря высокой чистоте и выходу, полученные результаты свидетельствуют о том, что промывка ACN с последующим повторным использованием кислоты является приемлемым методом промывки после кэпирования и что устранение псевдооживленных промывок не является ухудшением по сравнению с примерами 2 и 4. Общее количество использованной свежей кислоты, рассчитанное по массе питающей емкости до и после, составило 263 мл, т. е. примерно 2630 мл/ммоль. Это составляет 29,2% от типичного количества, используемого для Cytiva АКТА, которое обычно составляет около 9000 мл/ммоль.

**Пример 8. Получение антисмысловой нити AngPTL3 в масштабе 10 ммоль в реакторе с внутренним диаметром 4 дюйма**

Синтезировали одну антисмысловую нить AngPTL3 в экспериментальном масштабе в реакторе с псевдооживленным слоем. (Это та же последовательность, что и на фигуре 10).  
 5' MeMOP\*fg\*fU\*fAfUmA fAmCmC fUmUmC mCfAmUmUmUmGmA\*mG\*mG3'

Синтез этой молекулы с использованием способа с псевдооживленным слоем по настоящему изобретению описан в настоящем документе и включает стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и кэпирования для последовательного введения оставшихся фосфорамидитов. Одно из основных отличий в этом примере заключается в том, что его выполняли в большем масштабе (10 ммоль) и в реакторе большего размера с псевдооживленным слоем, который имеет одинаковый диаметр в направлении снизу вверх, внутренний диаметр 10,16 см и высоту 61 см. Реактор имеет плоское дно с фильтрующей фриттой. В таком реакторе большего диаметра псевдооживление является достаточным без более широкой зоны воронки в верхней части. Чем больше диаметр реактора, тем меньше влияние стенок, поэтому легче обеспечивать полное псевдооживление и перераспределение твердых и жидких веществ без использования верхней секции большого диаметра. Псевдооживление в начале каждой стадии реакции обычно увеличивает высоту взвеси в реакторе лишь примерно на 2-4 см. Устройство для этого синтеза показано на фигуре 9. Другое отличие этого примера состоит в том, что для промывки перед деблокированием использовали толуол. Кроме того, как и в примере 6, в примере 8 интегрировано повторное использование растворителя от одного фосфорамидитного цикла к другому, что снижает объемы растворителя для промывки. Более чистые промывки после деблокирования перекачивают в емкость для повторного использования ACN и используют в первой порции промывок после деблокирования в

следующем фосфорамидитном цикле. В таблице 31 представлено руководство по различным вариантам реализации в примерах реакторов с псевдооживленным слоем.

К концу эксперимента высота слоя смолы, смоченной АСN, достигала 5 см и в сухом состоянии - 4 см. Максимальная высота слоя смолы, равная 6 см, была достигнута во время нисходящих фаз на последней стадии деблокирования. Максимальный перепад давления через слой смолы во время эксперимента составлял 15 фунт/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.), поскольку это было давление подачи азота, используемого для прокачивания жидкости через слой смолы. Для реакций сочетания использовали два эквивалента амидита, как в примерах 6 и 7. Общие условия синтеза приведены в таблице 22.

Таблица 22. Условия синтеза для примера 8.

Элемент	Значение	Единицы
Загрузка смолы	247	мкмоль/грамм
Исходное количество смолы	40,50	грамм
Масштаб синтеза	10	ммоль
Деблокирующий раствор, 3% DCA, количество за цикл	3100 (основания от 1 до 5) 3300 (основания от 6 до 10) 3500 (основания от 11 до 21)	мл
Время реакции деблокирования	8 (основания от 1 до 5) 9 (основания от 6 до 10) 10 (основания от 11 до 21)	мин
Концентрация амидита	0,1	М в ACN
Количество эквивалентов амидита	2	экв.
Концентрация активатора	0,5	М в ACN
Количество эквивалентов активатора	10	экв.
Раствор амидита, количество на один цикл	200	мл
Раствор активатора, количество на один цикл	200	мл
Время реакции сочетания	15 (основания 8, 12, с 15 по 21) 10 (все остальные основания)	мин
Количество эквивалентов йода	2,1 (основания с 3 по 4) 2,65 (основания с 5 по 18)	экв.
Раствор окислителя, количество на один цикл	420 (основания с 3 по 4) 530 (основания с 5 по 18)	мл
Время окисления	5	мин
Количество эквивалентов сульфурящего реагента	13	экв.
Сульфурящий раствор, количество на один цикл	650	мл
Время сульфирования	10	мин
Кэпирующий раствор А, количество на один цикл	350	мл
Кэпирующий раствор В, количество на один цикл	350	мл
Время кэпирования	4	мин

Начинали с mG, связанного известными способами со смолой NittoPhase HL 2' OMeG(iBu) 250 (247 мкмоль/г) (далее упоминаемого как «mG-смола»), а настройки устройства синтезатора показаны на фиг. 9. Использовали ACN для суспендирования 40,50 г (10,0 ммоль) mG-смолы в реакторе с внутренним диаметром 10,16 см с сетчатым фильтром с 40-микронной фриттой на дне. Начальная глубина смолы составляла примерно 1 см в высоту.

10

Получали следующие растворы реагентов:

Все растворы амидитов были получены с использованием ACN производства Fisher, партия № 212215. Растворяли амидиты в растворителе ACN следующим образом. Перемешивали до растворения. В герметично закрываемые флаконы добавляли сухие набивки из

5 молекулярных сит.

	Требуемые амидиты:	Требуемый растворитель:
	mA 50,79 г	572 мл
	mC 81,15 г	1012 мл
10	mG 49,76 г	572 мл
	mU 93,73 г	1232 мл
	fA 69,37 г	792 мл
	fG 30,20 г	352 мл
	fU 59,30 г	792 мл
15	MeMOP, 19,59 г	352 мл

Кэпирующий раствор В1:

Уксусный ангидрид: Macron Fine Chemicals, партия № 0000239131  
 Ацетонитрил: Fisher, партия № 206496

20 Загружали 1657 мл уксусного ангидрида и 2486 мл ацетонитрила в питающую емкость.

Кэпирующий раствор В2:

2,6 - Лутидин: Acros, партия № A0428332  
 Ацетонитрил: Fisher, партия № 206496

25 Загружали 2486 мл лутидина и 1657 мл ацетонитрила в питающую емкость.

Кэпирующий раствор А:

1-Метилимидазол: Acros, партия № A0425789  
 ACN: Fisher, партия № 206496

30 Загружали 1657 мл имидазола. Загружали 6628 мл ACN.

Сульфурющий раствор, 0,2 М гидрида ксантана:

Гидрид ксантана: TCI, партия № QLXKC-RI  
 Пиридин: Fishers, партия № 208059

Загружали 3775 мл пиридина. Загружали 114 г ХН в емкость с пиридином. Перемешивали до растворения.

Окислительный раствор:

- 5 Раствор йода (0,05 М)  
Honeywell, партия № EA702-US  
Загружали 10 кг исходного раствора из кега в питающий бак.

Раствор активатора:

- 10 Honeywell, партия № EA952-US  
Загружали 5 кг исходного раствора из кега в питающий бак.

3% раствор DCA в толуоле:

- DCA: Supelco, партия № 61069116
- 15 Толуол: Superior, партия № FH11313266  
Партия №1
1. Загружали 18201 мл толуола в бутыль
  2. Загружали 563 мл DCA в бутыль
  3. Выливали бутыль в питающую емкость
- 20 Партия №2
1. Загружали 18428 мл толуола в бутыль
  2. Загружали 570 мл DCA в бутыль
  3. Выливали бутыль в питающую емкость
- Партия №3
- 25
1. Загружали 18483 мл толуола в бутыль
  2. Загружали 572 мл DCA в бутыль
  3. Выливали бутыль в питающую емкость
- Партия №4
1. Загружали 18575 мл толуола в бутыль
- 30
2. Загружали 575 мл DCA в бутыль
  3. Выливали бутыль в питающую емкость

- Заполняли все насосы и линии подачи. Пропускали ACN через слой молекулярных сит на пути в питающую емкость с инертной атмосферой. ACN, толуол и DCA в толуоле из питающих емкостей подавали под давлением и регулировали с помощью вентиляей
- 35

автоматического регулирования потоков. Для всех остальных сырьевых потоков использовали перистальтические насосы и питающие емкости. Растворы амидитов хранили отдельно в питающих емкостях, обозначенных «АМ. 1 л» и присоединенных к перистальтическим насосам, подключенным к вентилям V901A – V908A на фиг. 9. Для фосфорамидите MeMOP использовали одну из питающих емкостей АМ. Растворы активатора и ДЭА находились в питающих емкостях с маркировкой «Актив. 5 гал.» и «ДЭА», соответственно, на фиг. 9.

Для каждого фосфорамидита, добавленного в синтез, последовательно выполняли стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования, если в последовательности присутствует связь P=S) и кэпирования, как описано ниже. Кэпирование не требуется после присоединения фосфорамидита MeMOP в 21 цикле.

Во время реакций сочетания, окисления, сульфирования и кэпирования продолжали псевдооживление в цикле включения/выключения в течение большей части установленного времени реакции. Следует отметить, что псевдооживление не обязательно проводить с циклом включения/выключения. Псевдооживление может происходить посредством барботажа в течение всего времени без прокачивания вверх и вниз. Представленный способ является продолжением экспериментов в исследовательском масштабе. В исследовательском масштабе в реакторе малого диаметра прокачивание вверх и вниз во время псевдооживления дает некоторое преимущество, поскольку оно способствует первоначальному смачиванию и псевдооживлению всех гранул смолы, после чего движение в поршневом режиме не дает дополнительных преимуществ. При больших диаметрах, например, в описанном реакторе диаметром 4 дюйма, прокачивание в режиме поршневого потока посредством осуществления цикла включения/выключения не требуется.

Во время реакции снятия защиты слой смолы сначала подвергали псевдооживлению с использованием 200-250 мл раствора DCA, а затем продолжали реакцию снятия защиты до конца реакции в режиме поршневого потока без псевдооживления. Псевдооживление выполняли посредством барботажа газообразного азота через нижний сетчатый фильтр путем открывания вентиля 956 или 958 (V956, V958) и вентиля 953 одновременно с открыванием выпускного вентиля зоны подачи (V952). Если в процедуре указано, что жидкость прокачивают вниз через слой смолы, это означает, что сливной насос на выходе из нижней части реактора работает с установленным заданным значением, в то время как давление азота давит на верхнюю часть слоя смолы, продавливая жидкость вниз. Перистальтический насос предназначен для измерения расхода жидкости через слой с регулируемой скоростью.

**Промывка толуолом:** загрузить толуол (300 мл) в зону подачи. Закачать толуол в зону подачи с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать толуол в реактор. Выполнить псевдооживление слоя смолы 4 раза, каждый раз по 2 секунды, для достижения полного контакта жидкости с твердым веществом, набухания гранул смолы и повторного осадения слоя смолы. Включить насос для отходов и обеспечить давление азота в верхней части зоны подачи с помощью вентиля 951, чтобы толуол начал стекать вниз через слой смолы и выходить из нижней части реактора. В зону подачи загрузить еще 200 мл толуола, который подают в верхнюю часть реактора одновременно с откачиванием толуола из нижней части. Скорость сливного насоса устанавливают таким образом, чтобы для откачивания 500 мл толуола потребовалось 2 минуты. Остатки промывочного растворителя выкачивают через дно фильтра.

**Реакция деблокирования:** Загрузить деблокирующий раствор (Таблица 22, 200 мл) в зону подачи. Прокачать деблокирующий раствор в зону подачи с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать деблокирующий раствор в реактор. Выполнить псевдооживление слоя смолы в течение 7 секунд для достижения полного контакта жидкости с твердым веществом и повторного осадения слоя смолы. Включить насос для отходов и обеспечить давление азота в верхней части зоны подачи с помощью вентиля 951, чтобы раствор DCA начал стекать через слой смолы и выходить из нижней части реактора. Одновременно обеспечить подачу большего количества раствора DCA в зону подачи, который подают в верхнюю часть реактора одновременно с его откачиванием из нижней части. Откачивание деблокирующего раствора начинают за 5-30 секунд до начала второй подачи. Время можно регулировать. Задача состоит в том, чтобы откачивать до тех пор, пока уровень жидкости деблокирующего раствора не станет чуть выше верхней части слоя смолы для того, чтобы уменьшить обратное смешивание над слоем смолы, когда свежий деблокирующий раствор начнет поступать в реактор. Скорость сливного насоса устанавливают для достижения полного откачивания за требуемое время реакции, указанное в таблице 22. Деблокирующий раствор добавляют в реактор примерно с той же скоростью, с которой его выкачивают, устанавливая определенный % открывания вентиля регулирования подачи. Оставшийся раствор выкачивают в отходы через дно фильтра.

**Промывка № 1:** загрузить растворитель ACN в зону подачи по линии подачи кислоты (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать растворитель в реактор со слоем смолы. Когда растворитель поступает в реактор, он орошает его стенки. Выполнить псевдооживление один раз в течение 5 секунд. Прокачать через реактор в отходы.

Промывка № 2, 3, 4, 5: загрузить растворитель ACN из емкости для повторного использования ACN в зону подачи по линии подачи растворителя (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Закачать растворитель в реактор через распылительный конус, чтобы обеспечить равномерное распределение растворителя без нарушения слоя смолы. Прокачайте растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать оставшийся растворитель ACN через нижнюю часть фильтра. Повторите такую же промывку еще 3 раза.

Промывка № 6, 7, 8: загрузить свежий растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Закачать растворитель в реактор через распылительный конус, чтобы обеспечить равномерное распределение растворителя без нарушения слоя смолы. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в емкость для повторного использования ACN. Повторите такую же промывку еще 2 раза.

Промывка № 9: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать растворитель в реактор со слоем смолы. Когда растворитель поступает в реактор, он орошает его стенки. Выполнить псевдооживление один раз в течение 5 секунд. Откачать растворитель ACN из нижней части фильтра в емкость ACN для повторного использования.

**Реакция сочетания:** закачать требуемый амидит (200 мл) в зону активации амидита и прокачать его азотом. Закачать раствор активатора (200 мл) в зону активации амидита и прокачать азотом. Смешайте их вместе, барботируя азот в нижней части амидитной зоны в течение примерно 2 секунд. Прокачать полученную смесь в зону подачи, а затем в реактор для инициации реакции сочетания на смоле. Выполнять периодическое псевдооживление смолы в реакторе в течение всего времени реакции сочетания (10 или 15 минут), примерно раз в 45 секунд, барботируя азот через дно реактора со смолой, каждый раз в течение 15 секунд. Также допустимо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение всего времени реакции. По истечении времени реакции откачать раствор для реакции сочетания в отходы через нижнюю часть фильтра.

Промывка растворителем: загрузить растворитель ACN в зону активации амидита (200 мл) через трубку подачи амидита, чтобы удалить из питающей трубки остаточные капли, затем прокачать его в зону подачи, а затем прокачать в реактор со смолой. Когда

раствор поступает в реактор, он орошает его стенки. Прокачать через реактор в отходы без псевдооживления.

**Реакция окисления** (если требуется вместо сульфирования): загрузить ACN (200 мл) в зону смешивания активатора амидита, чтобы он был готов к промывке смолы сразу после окончания реакции окисления. Растворитель подают в зону смешивания активатора амидита через спрейбол, орошая все стенки. Загрузить 0,05 М раствор йода (530 мл) в зону подачи, прокачивая его азотом, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать раствор в реактор для инициации реакции окисления на смоле. Выполнять периодическое псевдооживление реактора в течение всего времени окисления (~4 минуты), примерно раз в 30 секунд, барботируя азот через дно реактора со смолой, каждый раз в течение 12 секунд. Также допустимо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение всего времени реакции. Начать откачивать окислительный раствор через слой смолы со скоростью 540 мл/мин в течение 65 секунд. Прокачать оставшийся окислительный раствор для сливания в отходы через дно фильтра.

Промывка № 1: прокачать 200 мл промывочного растворителя ACN (из зоны смешивания активатора амидита) в зону подачи, а затем прокачать его в реактор, чтобы промыть смолу. Растворитель подают на смолу в реакторе через конический распылитель, чтобы обеспечить равномерное распыление поверх слоя смолы и сохранения плоскостности слоя смолы, благодаря чему промывка в режиме поршневого потока становится более эффективной. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы.

Промывка № 2: загрузить ACN (200 мл) в зону подачи по линию подачи окислительного раствора, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель в реактор. Когда раствор поступает в реактор, он орошает его стенки. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы.

Промывка № 3, 4, 5: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Закачать растворитель в реактор через распылительный конус, чтобы обеспечить равномерное распределение растворителя без нарушения слоя смолы. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Выкачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы. Повторите такую же промывку еще 2 раза.

Промывка № 6: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать растворитель в реактор со слоем смолы. Когда растворитель поступает в реактор, он орошает его стенки. Выполнить псевдооживление один раз в течение 5 секунд.

5 Откачать растворитель ACN из нижней части фильтра в отходы.

**Реакция сульфирования (тиолирования)** (если требуется вместо окисления): загрузить ACN (200 мл) в зону смешивания активатора амидита, чтобы он был готов к промывке смолы сразу после окончания реакции сульфирования. Загрузить 0,2 М раствор гидрида ксантана (650 мл) в зону подачи, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок. Прокачать раствор в реактор для инициации реакции сульфирования на смоле. Периодически выполнять псевдооживление смолы в реакторе в течение всего времени окисления (~8 минут), примерно раз в 30 секунд, барботируя азот через дно реактора со смолой, каждый раз в течение 12 секунд. Также допустимо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение всего времени реакции. Начать откачивать раствор гидрида ксантана через слой смолы при заданной скорости насоса 700 мл/мин в течение 60 секунд. Прокачать оставшийся раствор гидрида ксантана для сливания в отходы через дно фильтра.

Промывка № 1: прокачать 200 мл промывочного растворителя ACN (из зоны смешивания активатора амидита) в реактор, чтобы промыть смолу. Растворитель подают на смолу в реакторе через конический распылитель. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы.

Промывка № 2: загрузить ACN (200 мл) в зону подачи по линии подачи раствора гидрида ксантана, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель в реактор. Когда раствор поступает в реактор, он орошает его стенки. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы.

Промывка № 3, 4, 5: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Закачать растворитель в реактор через распылительный конус, чтобы обеспечить равномерное распределение растворителя без нарушения слоя смолы. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы. Повторите такую же промывку еще 2 раза.

Промывка № 6: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать растворитель в реактор со слоем смолы. Когда растворитель поступает в реактор, он орошает его стенки. Выполнить псевдооживление один раз в течение 5 секунд.

5 Откачать растворитель ACN из нижней части фильтра в отходы.

**Реакция кэпирования:** загрузить кэпирующий раствор А и кэпирующий раствор В (по 350 мл каждого) в зону подачи, прокачивая их азотом для очистки питающих трубок. Прокачать раствор в реактор для инициации реакции кэпирования на смоле. Выполнить псевдооживление смолы в реакторе 2 раза, барботируя азот через дно реактора со смолой, каждый раз в течение 12 секунд. Общее время обоих псевдооживлений составляет примерно 1 минуту. Начать откачивать реакционный раствор через слой смолы со скоростью 400 мл/мин в течение 70 секунд. Откачать остаточный реакционный раствор из нижней части фильтра.

15 Промывка № 1, 2: загрузить ACN (100 мл) в зону подачи по линии подачи кэпирующего раствора А, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок, и загрузить ACN (100 мл) в зону подачи по линии подачи кэпирующего раствора В, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок. Прокачать растворитель в реактор. Когда раствор поступает в реактор, он орошает его стенки. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы. Повторить такую же промывку еще 1 раз.

25 Промывка № 3, 4: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Закачать растворитель в реактор через распылительный конус, чтобы обеспечить равномерное распределение растворителя без нарушения слоя смолы. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Откачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы. Повторить такую же промывку еще 1 раз.

30 Промывка № 5: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать растворитель в реактор со слоем смолы. Когда растворитель поступает в реактор, он орошает его стенки. Выполнить псевдооживление один раз в течение 5 секунд. Откачать растворитель ACN из нижней части фильтра в отходы.

35 **Время:** общий хронометраж типичного полного амидитного цикла было следующим, начиная с 9:22 утра:

- 9:22 утра: промывка толуолом, псевдооживление четыре раза,  
9:28: подача раствора кислотного реагента, псевдооживление один раз,  
9:35: откачивание раствора кислотного реагента,  
9:37: промывка в псевдооживленном слое, распыление растворителя на стенки при входе в  
5 реактор  
9:39: промывка в режиме поршневого потока с повторным использованием ACN,  
растворитель поступает на смолу в реакторе через конический распылитель  
9:41: промывка в режиме поршневого потока с повторным использованием ACN,  
растворитель поступает на смолу в реакторе через конический распылитель,  
10 9:43: промывка в режиме поршневого потока с повторным использованием ACN,  
растворитель поступает на смолу в реакторе через конический распылитель,  
9:44: промывка в режиме поршневого потока с повторным использованием ACN,  
растворитель поступает на смолу в реакторе через конический распылитель,  
9:46: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе  
15 через конический распылитель,  
9:48: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе  
через конический распылитель,  
9:50: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе  
через конический распылитель,  
20 9:52: промывка в псевдооживленном слое, растворитель орошает стенки при входе в  
реактор,  
9:57: подача раствора связующего реагента,  
10:14: откачивание раствора связующего реагента,  
10:16: промывка в режиме поршневого потока, растворитель орошает стенки при входе в  
25 реактор  
10:21: подача раствора реагента ХН,  
10:30: откачивание раствора реагента ХН,  
10:32: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе  
через конический распылитель,  
30 10:35: промывка в режиме поршневого потока, растворитель орошает стенки при входе в  
реактор  
10:37: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе  
через конический распылитель,  
10:39: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе  
35 через конический распылитель,

- 10:41: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе через конический распылитель,
- 10:43: промывка в псевдооживленном слое, растворитель орошает стенки при входе в реактор
- 5 10:48: подача раствора кэпирующего реагента,
- 10:52: откачивание раствора кэпирующего реагента,
- 10:54: промывка в псевдооживленном слое, растворитель орошает стенки при входе в реактор,
- 10:56: промывка в псевдооживленном слое, растворитель орошает стенки при входе в
- 10 реактор,
- 10:59: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе через конический распылитель,
- 11:01: промывка в режиме поршневого потока, растворитель поступает на смолу в реакторе через конический распылитель,
- 15 11:03: промывка в псевдооживленном слое, растворитель орошает стенки при входе в реактор
- Описанный процесс проводили 4 дня подряд, выполняя 5, 5, 6 и 5 амидитных циклов в день. Каждую ночь смолу выдерживали в реакторе, погружая ее на ночь в ACN, и в атмосфере азота.
- 20 **Последний цикл:** последний амидит (MeMOP) не имеет защитной группы DMT в 5'-положении, поэтому для не требуется окончательное деблокирование. После завершения последнего сочетания MeMOP, промывки, сульфирования и промывки, выполняли промывку раствором ДЭА. Загрузить раствор ДЭА (500 мл) в зону подачи. Закачать раствор DEА в зону подачи с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать раствор в
- 25 реактор. Дважды выполнить псевдооживление слоя смолы для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Общее время обоих псевдооживлений составляет примерно 1 минуту. Начать прокачивать раствор ДЭА через слой смолы со скоростью 100 мл/мин в течение 600 секунд. Одновременно выполнить параллельное закачивание дополнительного количества
- 30 раствора ДЭА (500 мл) в зону подачи, чтобы он поступал в верхнюю часть реактора примерно с той же скоростью, с которой его откачивают. Закачать раствор DEА в зону подачи с помощью азота для очистки питающих трубок. Всего за 600 секунд через слой смолы прокачивают 1 л. Откачать остаточный раствор ДЭА в отходы из нижней части фильтра. Повторить процедуру обработки ДЭА еще раз.

Промывка № 1, 2: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Закачать растворитель в реактор через распылительный конус, чтобы обеспечить равномерное распределение растворителя без нарушения слоя смолы. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Выкачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы. Повторить такую же промывку еще 1 раз.

Промывка № 3: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать растворитель в реактор со слоем смолы. Когда растворитель поступает в реактор, он орошает его стенки. Выполнить псевдооживление один раз в течение 5 секунд. Откачать растворитель ACN из нижней части фильтра в отходы.

Промывка № 4, 5: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Закачать растворитель в реактор через распылительный конус, чтобы обеспечить равномерное распределение растворителя без нарушения слоя смолы. Прокачать растворитель ACN через слой смолы со скоростью 300 мл/мин. Выкачать остатки растворителя ACN из нижней части фильтра в отходы. Повторить такую же промывку еще 1 раз.

Промывка № 6: загрузить растворитель ACN в зону подачи (200 мл). Закачать промывочный растворитель в зону подачи с помощью азота, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать растворитель в реактор со слоем смолы. Когда растворитель поступает в реактор, он орошает его стенки. Выполнить псевдооживление один раз в течение 5 секунд. Откачать растворитель ACN из нижней части фильтра в отходы.

**Сушка:** выгрузить смолу из реактора. Отфильтровать на лабораторном фильтре. Высушить посредством продувания слоя смолы азотом в течение 5-6 часов. Для полученных образцов было удалено 2,5 г связанного со смолой материала, в том числе 2 г вымытого из реактора и 0,5 г из массы после сушки. Прирост неочищенной массы составил 7,99 г/ммоль, включая образцы.

Выполняли отщепление и удаление защиты (C/D) в объеме, используя примерно половину неочищенного продукта, связанного смолой, за один раз. C/D осуществляли путем смешивания смолы с 28% водным раствором гидроксида аммония (30 мл/г смолы) и нагревания до 38 °C в закрытом сосуде в течение 18-20 часов. В сосуд высокого давления с резьбой Асе объемом 1,85 л, оснащенный манометром, предохранительным клапаном сброса давления 25 фунтов/кв.дюйм изб., термopарой, нагревательной рубашкой и

магнитной мешалкой, загружали защищенный ANGPL3 AS (56,1 г, 6,798 ммоль) и гидроксид аммония (28% мас.) в воде (1,68 л, 2000 г, 10000 ммоль). Тонкую суспензию герметично закрывали и перемешивали при нагревании до 38 °С в течение ночи.

5 Через 18 часов при 38 °С выключали нагрев и устанавливали баню с ледяной водой, чтобы охладить реактор до температуры ниже комнатной. Смоле давали отстояться, и взвешенную аликвоту надосадочной жидкости разбавляли взвешенным количеством воды Mill-Q.

масса аликвоты = 0,1754 г

масса воды Milli-Q = 20,2768 г

10 После завершения C/D приступали к обработке основной массы реакционной смеси. Фильтровали основной объем раствора для удаления отработанной смолы. Промывали отработанную смолу 3 x 150 мл смеси 1:1 EtOH:H<sub>2</sub>O. Объединяли фильтрат и промывочные растворы и концентрировали на роторном испарителе (на бане при 40 °С) для удаления большей части аммиака. Повторяли ту же процедуру для второй половины материала, связанного смолой. Результаты СВЭЖХ показали FLP 75,3% для образца из первой 15 половины и 78,9% для образца из второй половины. Подробные данные представлены в таблице 17, результаты СВЭЖХ для примеров с 6 по 10 и сравнение с Cytiva АКТА. Определяли значения OD/ммоль, записанные в таблице 23. Выход неочищенного продукта с поправкой на чистоту составлял примерно 58% для первой половины и 62% для второй 20 половины материала. Для сравнения, выход неочищенного продукта с поправкой на чистоту в предыдущем эксперименте с 1 кг cGMP составлял 57%.

Таблица 23. Обобщенные данные по выходу и чистоте для синтеза в масштабе 10 ммоль, описанного в примере 8.

25

	Первая половина партии из синтезатора	Вторая половина партии из синтезатора
масштаб	5 ммоль	5 ммоль
FLP% (гомогенизированный образец) после ультрафильтрации неочищенного материала	75,32%	78,92%
OD/ммоль	155	157
Выход неочищенного продукта в % по OD	77%	78%
Выход с поправкой на чистоту по OD	58%	62%
Масса продукта	27,04 г	26,97 г

Полученный материал подвергали предварительной обработке методом хроматографической очистки, которая выходит за рамки настоящего документа.

**Пример 9: Полупромышленный синтезатор с псевдооживленным слоем с интегрированной в процесс многократной промывкой.**

5

Получали такую же антисмысловую нить AngPTL3 (фиг. 10) в модифицированной версии системы реактора с псевдооживленным слоем из примера 8.

5' MeMOP\*fG\*fU\*fAfUmA fAmCmC fUmUmC mCfAmUmUmUmGmA\*mG\*mG3'

10

Синтез этой молекулы с использованием способа с псевдооживленным слоем по настоящему изобретению описан в настоящем документе и включает стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и кэпирования для последовательного введения оставшихся фосфорамидитов. Основные различия между примером 8 и примером 9 заключаются в том, что система была модифицирована для включения интегрированной в процесс многократной промывки, и не выполняли кэпирование для циклов 2 - 9 (фосфорамидиты 3 - 10). Кэпирование не требуется после присоединения фосфорамидита MeMOP в 21 цикле.

15

К концу эксперимента высота слоя смолы, смоченной ацетонитрилом, достигала 5 см и в сухом состоянии - 4 см. Максимальная высота слоя смолы, равная 6 см, была достигнута во время нисходящих фаз на последней стадии деблокирования. Максимальный перепад давления через слой смолы во время эксперимента составлял 15 фунт/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.), поскольку это было давление подачи азота, используемого для прокачивания жидкости через слой смолы. Для реакций сочетания использовали два эквивалента амидита, как в примерах 6, 7 и 8. Общие условия синтеза приведены в таблице 24. Время деблокирования и объем свежего раствора DCA от начала до конца синтеза приведены в таблице 25.

20

25

Таблица 24. Условия синтеза для примера 9.

Элемент	Значение	Единицы
Загрузка смолы	249	мкмоль/грамм
Исходное количество смолы	40,30	грамм
Масштаб синтеза	10	ммоль
Концентрация амидита	0,1	М в ацетонитриле
Количество эквивалентов амидита	2	экв.
Концентрация активатора	0,5	М в ацетонитриле
Количество эквивалентов активатора	10	экв.
Раствор амидита, количество на один цикл	200	мл
Раствор активатора, количество на один цикл	200	мл
Время реакции сочетания	15 (циклы с 8, 12, с 15 по 21) 10 (все остальные циклы)	мин
Количество эквивалентов йода	2,1 (циклы с 3 по 4) 2,65 (циклы с 5 по 18)	экв.
Раствор окислителя, количество на один цикл	420 (циклы с 3 по 4) 530 (циклы с 5 по 18)	мл
Время окисления	5	мин
Количество эквивалентов сульфорирующего реагента	13	экв.
Сульфорирующий раствор, количество на один цикл	650	мл
Время сульфирования	10	мин
Кэпирующий раствор А, количество на один цикл	100	мл
Кэпирующий раствор В, количество на один цикл	100	мл
Время кэпирования	4	мин

содержание воды по Карлу Фишеру в АСН, используемом для получения раствора амидита:  
5 56 м.д. воды

Таблица 25. Время деблокирования и объем свежего раствора DCA от начала до конца синтеза для примера 9.

цикл	амидит	объем 3% раствора DCA (мл)	время прокачивания в режиме поршневого потока для деблокирования (минуты)
1	MGS	1400	8,3
2	MAS	1500	8,3
3	MG	1570	8,3
4	MU	1640	8,3
5	MU	1710	9
6	MU	1780	9
7	MU	1850	9
8	FA	1920	9
9	MC	1990	9
10	MC	2060	9,7
11	MU	2130	9,7
12	FU	2200	9,7
13	MC	2270	9,7
14	MC	2340	9,7
15	FA	2410	9,7
16	MA	2480	9,7
17	FU	2550	9,7
18	FA	2620	9,7
19	FUS	2690	9,7
20	FGS	2760	9,7
21	MEMOPS	2830	9,7

5 Реагенты и номера партий, использованные для примера 9, указаны в таблице 26.

Таблица 26. Партии реагентов, использованные для примера 9.

Реагент	Партия
ACN	Fisher 214141
Кэпирующий раствор А, 1-метилимидазол/ACN (20/80 об./об.)	см. ниже
Кэпирующий раствор В, 1:1 смесь В1 и В2. В1 представляет собой 40% об. уксусного ангидрида в ACN. В2 представляет собой 60% об. 2,6-лутидина в ACN	см. ниже
0,2 М гидрида ксантана в смеси ACN/пиридин (70/30 об./об.)	см. ниже
0,05 М йода в смеси пиридин/вода (90/10 об./об.)	см. ниже
Деблокирование, дихлоруксусная кислота (3% DCA/толуол, об./об.)	см. ниже
ДЭА, 20% диэтиламина в ACN (20/80 об./об.)	см. ниже
Реагент-активатор, 0,5 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ACN	DW336-US
Kinovate Nittophase HL 2'OMeG(iBu) 250, 249 мкмоль/г	H08023

10 Все растворы амидитов были получены с использованием ACN производства Fisher, партия № 212215. Растворяли амидиты в растворителе ACN следующим образом. Смешивали до

растворения. В герметично закрываемые флаконы добавляли сухие набивки из молекулярных сит.

Используемые партии ACN: EMD, партия № 52261, EMD, партия № 52261, Fisher, № 214141

5	Требуемые амидиты:	Требуемый растворитель:
	mA 45,91 г	517 мл
	mC 76,74 г	957 мл
	mG 44,98 г	517 мл
	mU 89,55 г	1177 мл
10	fA 64,56 г	737 мл
	fG 25,48 г	297 мл
	fU 55,19 г	737 мл
	MeMOP, 16,53 г	297 мл

- 15 Молекулярные массы амидита были следующими:  
 фосфораמידит mA DMT-2'-O-MeA(bz), ММ 887,97  
 фосфораמידит mC DMT-2'-O-MeC(Ac), ММ 801,87  
 фосфораמידит mG DMT-2'-O-MeG(iBu), ММ 869,95  
 фосфораמידит mU DMT-2'-O-MeU-CE, ММ 760,82
- 20 фосфораמידит fA DMT-2'-F-dA(bz), ММ 875,93  
 фосфораמידит fC DMT-2'-F-dC(Ac), ММ 789,84  
 фосфораמידит fG DMT-2'-F-dG(iBu), ММ 857,9  
 фосфораמידит fU DMT-2'-F-dU-CE, ММ 748,8  
 MeMOP, ММ 556,5

25

Получали следующие растворы реагентов:

Кэпирующий раствор В1:

Уксусный ангидрид: Macron Fine Chemicals, партия № 0000239131

Ацетонитрил: Fisher, партия № 214141

- 30 В бутылку загружали 481 мл уксусного ангидрида и 722 мл ацетонитрила.

Кэпирующий раствор В2:

2,6 - Лутидин: Acros, партия № A0428332

Ацетонитрил: EMD, партия № 52261

- 35 В бутылку загружали 722 мл лутидина и 481 мл ацетонитрила.

Кэпирующий раствор А:

1-Метилимидазол: Alfa Aesar, партия № 5009J24W

Ацетонитрил: Fisher, партия № 214141

- 5 Загружали 481 мл имидазола. Загружали 1924 мл ACN.

Сульфидующий раствор, 0,2 М гидрида ксантана:

Гидрид ксантана: TCI, партия № QLXKC-LI

Пиридин: Fishers, партия № 208059

- 10 Загружали 3775 мл пиридина. В бутылку с пиридином загружали 114 г ХН. Смешивали до растворения.

Окислительный раствор:

Раствор йода (0,05 М)

- 15 Honeywell, партия № EA702-US

В питающий бак загружали ~9 кг исходного раствора из кега.

Раствор активатора:

Honeywell, партия № EA713-US

- 20 В питающий бак загружали ~5 кг исходного раствора из кега.

20% ДЭА в ацетонитриле:

ДЭА: Sigma-Aldrich, партия № STBJ5069

Ацетонитрил: Fisher, партия № 214141

- 25 В бутылку загружали 400 мл ДЭА. В бутылку загружали 1600 мл ACN.

3% раствор DCA в толуоле:

DCA: Sigma Aldrich, партия № MKCQ92

Толуол: Superior, партия № HX11315122

30

Партия №1

1. В бутылку загружали 19240 мл толуола.

2. В бутылку загружали 595 мл DCA.

3. Выливали бутылку в питающую емкость.

35

## Партия №2

1. В бутылку загружали 20311 мл толуола.
2. В бутылку загружали 628 мл DCA.
3. Выливали бутылку в питающую емкость.

5

## Партия №3

1. В бутылку загружали 12272 мл толуола.
2. В бутылку загружали 380 мл DCA.
3. Выливали бутылку в питающую емкость.

10

Начинали с mG, связанного известными способами со смолой NittoPhase HL 2' OMeG(iBu) 250 (249 мкмоль/г) (далее упоминаемого как «mG-смола»), а настройки устройства синтезатора показаны на фиг. 11. Использовали ACN для суспендирования 40,40 г (10,06 ммоль) mG-смолы в реакторе с внутренним диаметром 10,16 см с сетчатым фильтром с 40-микронной фриттой на дне. Начальная глубина смолы составляла примерно 1 см в высоту.

Заливали все насосы и линии подачи. Прокачивали ACN через слой молекулярных сит на пути в питающую емкость с инертной атмосферой. ACN и DCA в толуоле подавали из питающих баков под давлением и регулировали автоматическими вентилями управления потоком. Для всех остальных сырьевых потоков использовали перистальтические насосы и питающие емкости. Растворы амидитов хранили отдельно в питающих емкостях, обозначенных «АМ. 1 л» и присоединенных к перистальтическим насосам, подключенным к вентилям V1101A – V1108A на фиг. 11. Для фосфорамидите MeMOP использовали одну из питающих емкостей АМ. Растворы активатора и ДЭА хранили в питающих емкостях, обозначенных «Актив. 5 гал.» и «ДЭА 1 л», соответственно, на фиг. 11.

Для каждого фосфорамидита, добавленного в синтез, последовательно выполняли стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования, если в последовательности присутствует связь P=S) и кэпирования, как описано ниже. Кэпирование не требуется для циклов 2 - 9 (нуклеозиды с 3 по 10). Кэпирование не требуется после присоединения MeMOP в 21 цикле.

Во время реакций сочетания, окисления, сульфирования и кэпирования продолжали псевдооживление в цикле включения/выключения в течение большей части установленного времени реакции. Следует отметить, что псевдооживление не обязательно проводить с циклом включения/выключения. Псевдооживление может происходить посредством барботажа в течение всего времени без прокачивания вверх и вниз. Представленный способ

35

является продолжением экспериментов в исследовательском масштабе. В исследовательском масштабе в реакторе малого диаметра прокачивание вверх и вниз во время псевдооживления дает некоторое преимущество, поскольку оно способствует первоначальному смачиванию и псевдооживлению всех гранул смолы, после чего движение в поршневом режиме не дает дополнительных преимуществ. При больших диаметрах, например, в описанном реакторе диаметром 4 дюйма, прокачивание в режиме поршневого потока посредством осуществления цикла включения/выключения не требуется.

Как и в предыдущих примерах, псевдооживление осуществляли посредством пропуска газа газообразного азота через нижний сетчатый фильтр, открывая вентиль 1156 или 1158 (V1156, V1158 на фиг. 11) одновременно с открыванием выпускного вентиля зоны подачи (V1152 на фиг. 11).

См. фиг. 11, фиг. 12 и фиг. 13 на протяжении всей процедуры. Вначале вручную наполняли все шесть бутылей для повторного использования от А до F и все 3 бутылки для повторного использования от А2 до С2, используя примерно 400 мл АСN.

Если в процедуре указано, что жидкость прокачивают вниз через слой смолы, это означает, что сливной насос на выходе из нижней части реактора работает с установленным заданным значением, в то время как давление азота давит на верхнюю часть слоя смолы, продавливая жидкость вниз. Перистальтический насос предназначен для измерения расхода жидкости через слой с регулируемой скоростью.

#### **Деблокирование:**

Сначала использовали повторно используемую кислоту из предыдущей стадии для псевдооживления смолы, набухания слоя смолы и смывания растворителя АСN. В первом амидитном цикле эту стадию выполняли с использованием свежего раствора DCA в толуоле, а затем ее выполняли с повторно используемым раствором DCA в толуоле для остальных амидитов. Установить вентиль 1125А в сторону повторного использования кислоты, открыть вентиль 1125F, открыть сливной вентиль 1152, открыть FCV1 для загрузки первой порции повторно используемой кислоты (250 мл). В контроллере в качестве противовеса используют питающий бак для измерения правильной массы. Закрывать FCV1, открыть вентиль 1125В подачи азота, прокачать питающую линию азотом в зону подачи, закрыть вентиль 1125В подачи азота. Закрывать сливной вентиль 1152, открыть вентиль 1151 подачи азота и прокачать раствор кислоты в реактор через распылительный конус. Закрывать вентиль 1151 подачи азота, открыть сливной вентиль 1152, открыть вентиль 1153 и открыть вентиль 1156 дозированной подачи азота. Это обеспечивает нагнетание азота в нижнюю часть реактора для псевдооживления смолы с раствором кислоты в течение заданного пользователем времени (20 секунд). Закрывать вентили 1156 дозированной подачи

азота, 1153, сливной вентиль 1152, открыть вентиль 1151 подачи азота для повторного прокачивания вниз. После завершения псевдооживления открыть вентиль 1159 и включить насос 1159, направить вентиль 1154 к вентилю 1160, направить вентиль 1160 к вентилю 1157, направить вентиль 1157 в отходы. Открыть вентиль 1125F, открыть FCV1. Это обеспечивает прокачивание повторно используемой кислоты через зону подачи и в реактор одновременно с откачиванием в нижней части. Полностью опорожнить содержимое емкости для повторно используемой кислоты. Количество варьируется от примерно 1150 мл для 1 цикла до 2600 мл для 21 цикла. См. таблицу 25. Количество свежей кислоты для 1 цикла становится количеством повторно используемой кислоты для 2 цикла и так далее.

5

10 Таким образом, количество повторно используемой кислоты для второй загрузки во 2 цикле составляет 1400 минус 250 мл, поскольку 250 мл было использовано для первой псевдооживленной порции, и так далее. На этой стадии вымывают весь растворитель ACN из смолы в отходы. После откачивания из емкости всей повторно используемой кислоты закрыть FCV1. Прокачать линию подачи в зону подачи с помощью азота, открыв 1125B

15 подачи азота. Завершить откачивание всей повторно используемой кислоты в отходы. Общее время откачивания в отходы варьируется от 3 минут для 1 цикла до 4 минут для 21 цикла, постепенно увеличиваясь, поскольку от одного цикла к следующему объем постепенно увеличивается.

Загрузить первую порцию свежей кислоты в зону подачи (150 мл), направив вентиль

20 1125A к источнику свежей кислоты, открыть вентиль 1125F, открыть выпускной вентиль 1152, открыть FCV1 для загрузки указанной массы свежей кислоты. В контроллере в качестве противовеса используют питающий бак для введения правильной массы. Закрыть сливной вентиль 1152, открыть вентиль 1151 подачи азота для прокачивания кислоты в реактор через распылительный конус для равномерного распыления поверх слоя смолы и

25 поддержания плоскостности слоя смолы. Открыть вентиль 1159, вентиль 1154 по направлению к вентилю 1160, вентиль 1160 по направлению к вентилю 1157, вентиль 1157 по направлению к баку с повторно используемой кислотой и включить насос 1159. Откачивание деблокирующего раствора начинают за 5-30 секунд до начала второй подачи. Время можно регулировать. Цель состоит в том, чтобы откачивать до тех пор, пока уровень

30 жидкости деблокирующего раствора не будет чуть выше верхней части слоя смолы для того, чтобы минимизировать обратное смешивание над слоем смолы, когда свежий деблокирующий раствор начнет поступать в реактор. Скорость нагнетательного насоса устанавливают для достижения полного откачивания за требуемое время реакции, указанное в Таблице 25. Деблокирующий раствор добавляют в реактор примерно с той же

35 скоростью, с которой его выкачивают, устанавливая определенный % открывания вентиля

1 регулирования подачи. Подавать раствор кислоты в верхнюю часть реактора  
одновременно с его откачиванием из нижней части реактора, открывая вентиль 1125F,  
открыть вентиль 1125B подачи азота, открыть FCV1 до значения, которое  
уравновешивается с потоком насоса 1159, так чтобы поддерживать уровень жидкой  
5 кислоты поверх слоя смолы при ее пропускании через смолу в режиме поршневого потока.  
FCV1 закрывается после достижения указанной пользователем общей массы кислоты.  
Общее количество загруженной кислоты, включая 150 мл, использованные для первой  
загрузки, указано для каждого цикла в таблице 25. Например, общее количество кислоты  
10 для 1 цикла составило 1400 мл, которое состояло из 150 мл для первой загрузки и 1250 мл  
для второй загрузки. Количество линейно увеличивалось с каждым циклом и достигло 2830  
мл к 21 циклу. По истечении времени откачивания открыть вентиль 1153 и вентиль 1155 и  
перекрыть подачу азота в зону подачи. Это обеспечивает прокачивание оставшейся  
кислоты в емкость для повторного использования кислоты до тех пор, пока давление в зоне  
15 подачи не упадет ниже заданного пользователем значения (например, давление упадет с 15  
фунтов/кв.дюйм изб. до 9 фунтов на кв.дюйм изб.), что обеспечивает опорожнение реактора  
до автоматического перехода на следующую стадию в последовательности.

#### **Интегрированная в процесс многократная промывка после деблокирования**

Первой стадии интегрированной в процесс многократной промывки после обработки  
кислотой является использование растворителя из бутылки А для промывки смолы и сброса  
20 ее в отходы. Следующей стадией является использование растворителя из бутылки В для  
прокачивания через смолу и перекачивания обратно в бутылку А. Затем растворителем из  
бутылки С промывают смолу в реакторе и выкачивают для наполнения бутылки В. И так  
далее. См. фиг. 11 и фиг. 12. В целом, схема промывки в данном эксперименте подробно  
описана в таблице 27. В указанной таблице «w2» представляет собой вторую порцию  
25 промывки после деблокирования. Ею промывают слой смолы, а затем откачивают через дно  
реактора в бутылку А. Как показано в таблице, «w2» становится первой порцией промывки  
после деблокирования для цикла 2. «w3» представляет собой 3 порцию промывки после  
деблокирования для цикла 1, она становится 2 порцией промывки после деблокировки для  
цикла 2, затем 1 порцией промывки после деблокирования для цикла 3. И так далее, как  
30 указано в таблице. Седьмую порцию промывки делят на 3 части, например w7a, w7b и w7c  
в цикле 1, как указано в таблице. Все три части по отдельности прокачивают через реактор  
и обратно в бутылку F, так что объединенный растворитель становится 6 порцией промывки  
в цикле 2 и так далее.

Таблица 27. Схема интегрированной в процесс многократной промывки для промывания после реакции деблокирования.

порция промывки после деблокирования	1	2	3	4	5	6	7	8	9
цикл 1	w1	w2	w3	w4	w5	w6	w7A	W7b	w7c
цикл 2	w2	w3	w4	w5	w6	w7	w8A	W8b	w8c
цикл 3	w3	w4	w5	w6	w7	w8	w9A	W9B	w9c
цикл 4	w4	w5	w6	w7	w8	w9	w10A	w10b	w10c
цикл 5	w5	w6	w7	w8	w9	w10	w11A	W11b	w11c
цикл 6	w6	w7	w8	w9	w10	w11	w12A	w12b	w12c
цикл 7	w7	w8	w9	w10	w11	w12	w13A	w13b	w13c
цикл 8	w8	w9	w10	w11	w12	w13	w14A	w14B	w14c
цикл 9	w9	w10	w11	w12	w13	w14	w15A	w15B	w15c
цикл 10	w10	w11	w12	w13	w14	w15	w16A	w16B	w16c
цикл 11	w11	w12	w13	w14	w15	w16	w17A	w17b	w17c
цикл 12	w12	w13	w14	w15	w16	w17	w18A	w18b	w18c
цикл 13	w13	w14	w15	w16	w17	w18	w19A	w19b	w19c
цикл 14	w14	w15	w16	w17	w18	w19	w20A	w20b	w20c
цикл 15	w15	w16	w17	w18	w19	w20	w21A	w21b	w21c
цикл 16	w16	w17	w18	w19	w20	w21	w22A	w22b	w22c
цикл 17	w17	w18	w19	w20	w21	w22	w23A	w23b	w23c
цикл 18	w18	w19	w20	w21	w22	w23	w24A	w24b	w24c
цикл 19	w19	w20	w21	w22	w23	w24	w25A	w25b	w25c
цикл 20	w20	w21	w22	w23	w24	w25	w26A	w26b	w26c
цикл 21	w21	w22	w23	w24	w25	w26	w27A	w27b	w27c

5

Вентили 12201А (в зону подачи) и вентили 12201В и 12201С подачи азота (фиг. 12) имеют общую пневмолинию привода; поэтому, когда вентиль 12201 открыт, он обеспечивает вытеснение из бутылки в зону подачи. Аналогичным образом, вентили 12200А (возврат из реактора) и выпускной вентиль № 12200В имеют общую пневмолинию привода; поэтому, когда вентиль 12200 открыт, в указанную бутылку поступает использованный промывочный растворитель из реактора.

Начать с открывания выпускного вентиля 1152, открыть вентиль 11201, открыть вентиль 11202. Азот вытесняет содержимое бутылки А в зону подачи. Бутылку А полностью опорожняют. Система автоматизации определяет момент полного опорожнения, закрывая выпускной вентиль 1152 и ожидая, пока давление в зоне подачи не увеличится до заданного пользователем значения, что означает, что весь растворитель перекачан из бутылки в зону подачи и вытеснен азотом в зону подачи. Открыть вентиль 1151 подачи азота, чтобы

15

прокачать растворитель из зоны подачи в реактор через распылительный конус, направив вентиль 1145 на распылительный конус для равномерного разбрызгивания поверх слоя смолы и сохранения плоскостности слоя смолы, что делает промывку более эффективной. Открыть вентиль 1159, вентиль 1154 по направлению к 1160, вентиль 1160 по направлению к 1157, вентиль 1157 по направлению к отходам. Включить насос 1159 и прокачать промывочный растворитель через слой смолы в отходы. По истечении времени откачки закрыть вентиль 1151, открыть вентиль 1153 и открыть вентиль 1155, чтобы сливать оставшийся промывочный растворитель в отходы до тех пор, пока давление в зоне не упадет ниже заданного пользователем значения (например, давление упадет с 15 фунтов/кв.дюйм изб. до 9 фунтов/кв.дюйм изб.). Это обеспечивает полное вытеснение жидкости из реактора в отходы. Одновременно включить насос 1159, чтобы вся жидкость также вытекла из насоса в отходы. Это единственная промывка из бутылей от А до F, которая идет в отходы. Она обеспечивает удаление большей части толуола и кислоты из смолы и их сброс в отходы. Остальные промывки возвращают в бутылки от А до Е. В представленной процедуре описано вытеснение растворителя из бутылки В и прокачивание его через реактор, а затем обратно в бутылку А, остальные выполняют аналогично. Открыть выпускной вентиль 1152, вентиль 11201, вентиль 11203 для прокачивания промывочного раствора из бутылки В в зону подачи, обеспечивая вытеснение до полного опорожнения бутылки. Проверку осуществляют с помощью системы автоматизации посредством закрывания выпускного вентиля 1152 и ожидания до тех пор, пока давление в зоне подачи не превысит установленное пользователем значение (9 фунтов/кв.дюйм изб.), что указывает на то, что вся жидкость перекачана и вытеснена азотом. Закрыть вентиль 11201 и вентиль 11203, открыть вентиль 1151 подачи азота, направить вентиль 1145 на распылительный конус и прокачать промывочный раствор из зоны подачи в реактор через распылительный конус на верхнюю часть смолы для равномерного распыления поверх слоя смолы и сохранения плоскостности слоя смолы. Открыть вентиль 1159, направить вентиль 1154 в направлении вентиля 11200, открыть вентиль 11200, открыть вентиль 11202. Включить насос 1159 для промывания растворителем слоя смолы и его возврата в бутылку А. По истечении заданного пользователем времени прокачки открыть вентиль 1153 и вентиль 1155 и закрыть вентиль 1151 подачи азота, и подождать, пока давление в зоне подачи не упадет ниже заданного пользователем значения (падение с 15 фунтов/кв.дюйм изб. до 9 фунтов/кв.дюйм изб.). Это обеспечивает полное прохождение растворителя через реактор и в бутылку А. Повторить описанную процедуру для использования растворителя в бутылки С для промывки слоя смолы и его возврата в бутылку В, затем из бутылки D в бутылку С и так далее. Пользователь имеет возможность указать, является ли какая-либо из промывок

псевдооживленной. Если пользователь выбирает псевдооживление одной из промывок, то азот закачивают через дно реактора с открытым вентилем 1152 после подачи промывки в реактор и перед включением насоса 1159. В описанном эксперименте ни одна из интегрированных в процесс многократных промывок не была псевдооживленной.

- 5 Пользователь имеет возможность указать, в какой из этих промывок система будет выполнять автоматическую промывку линии подачи кислоты, и в какой из этих промывок система будет выполнять автоматическую промывку стенок зоны подачи и стенок реактора. Например, предположим, что пользователь выбирает промывку линии подачи во время второй промывки. В этом случае после того, как промывочный растворитель из бутылки В
- 10 будет вытеснен из зоны подачи в реактор, он будет оставаться там до прокачивания через реактор, чтобы система могла выполнить вытеснение в линии подачи. Это выполняют посредством открывания вентиля 1125С и использования насоса № 1130 для подачи указанного объема растворителя АСN (50 мл) в зону подачи по линии подачи кислоты. Растворитель нагнетают посредством закрывания вентиля 1125С и открывания вентиля
- 15 1125В подачи азота. Затем растворитель вытесняют из зоны подачи в реактор, открывая вентиль 1151 подачи азота. Затем объединенные растворители в реакторе прокачивают через смолу и выводят в специальную бутылку А, как описано выше. Кроме того, например, предположим, что пользователь назначает выполнение промывки стенок реактора во время промывки растворителем АСN из бутылки F. В этом случае после того как растворитель из
- 20 бутылки F будет вытеснен в реактор, он будет оставаться там до промывки стенок реактора, после чего его прокачивают через смолу, промывку стенок реактора осуществляют следующим образом. Открыть выпускной вентиль 1152, открыть вентиль 1130В и открыть FCV2 до тех пор, пока указанная масса не будет вытеснена в зону подачи через спрейбол, омывающий стенки (50 мл). Вентиль 1130В открывают во время загрузки, потому что это
- 25 способствует работе спрейбола в данном масштабе, при этом азот, подаваемый через вентиль 1130В, также вытесняет растворитель в зону подачи. Затем закрыть FCV2, закрыть вентиль 1130В, закрыть выпускной вентиль 1152, открыть вентиль 1151 подачи азота и направить вентиль 1145 в сторону распылительного устройства на стенки реактора. Описанную процедуру повторяют еще раз для повторного орошения стенок зоны подачи и
- 30 повторного орошения стенок реактора. Затем объединенный промывочный растворитель из бутылки F и из обоих промывочных растворов для стенок реактора прокачивают через смолу в реакторе обратно в бутылку Е с помощью насоса 1159, как описано выше. По окончании этих промывок в режиме противотока бутылка F становится пустой.

**Промывка после деблокирования в режиме поршневого потока:**

Следующей стадией является промывка смолы в реакторе свежим растворителем ACN и откачивание его из реактора в бутылку F. Это выполняют с помощью программы промывки в режиме поршневого потока и указания места назначения как бутылки F. Пользователь может выбрать три места назначения, где будет выполнена программа промывки в режиме поршневого потока; бутылку F, бутылку C2 или отходы. Промывку в режиме поршневого потока выполняют следующим образом. Открыть выпускной вентиль 1152, открыть вентиль 1130В и открыть FCV2 до тех пор, пока указанная масса растворителя ACN не будет вытеснена в зону подачи через спрейбол, омывающий стенки (150 мл). Вентиль 1130В открывают во время загрузки, потому что это способствует работе спрейбола в указанном масштабе, при этом азот, подаваемый через вентиль 1130В, обеспечивает вытеснение растворителя в зону подачи. Затем закрыть FCV2, закрыть вентиль 1130В, закрыть выпускной вентиль 1152, открыть вентиль 1151 подачи азота и направить вентиль 1145 в сторону распылительного конуса в реактор для равномерного разбрызгивания поверх слоя смолы и сохранения плоскостности слоя смолы. Затем промывочный раствор прокачивают через слой смолы, открывая вентиль 1159 и включая насос 1159 и устанавливая следующие вентили V1154, V1160, V1157, V11200, V11300 в положения, соответствующие назначению (бутылку F, бутылку C2 или отходы). В данном случае пунктом назначения является бутылка F. Выполнить описанную стадию еще 2 раза, чтобы в общей сложности было проведено три промывки по 150 мл в режиме поршневого потока, через реактор и в бутылку F.

К циклу № 7 противоточная промывка из бутылки А содержала около 600 мл (450 мл свежего ACN для трех стадий промывки в режиме поршневого потока, 100 мл для промывки стенок реактора и 50 мл для промывки линии подачи). Общее количество второй промывки из бутылки В и 50 мл для прокачивания составляло 600 мл. Промывки с третьей по шестую из бутылок С, D, E, F составляли 550 мл (100 мл для промывки стенок реактора в сумме с 450 мл из бутылки F). Общий объем промывочного растворителя, протекающего через смолу для всех промывок после деблокирования, составлял около 4 л. Однако в систему было загружено только 600 мл свежего ацетонитрила. Остальное составлял повторно использованный ACN из бутылок от А до F. Такая интегрированная в процесс стратегия многократной промывки (таблица 27) делает промывку более эффективной. Образцы отбирали после последней промывки на протяжении всего цикла, от цикла 1 до цикла 21, и все образцы, измеренные с помощью ЯМР, содержали >99,9% ACN. Синтезатор Cytiva АКТА также обеспечивает содержание растворителя ACN 99,9% в конце промывки, но для достижения той же конечной точки промывки требуется в 7 раз больше промывочного растворителя на ммоль. Существует несколько причин повышения

эффективности промывки в текучей среде реактора, что делает ее более эффективной, чем промывка растворителем в реакторах с уплотненным слоем. (1) Реагенты сливают до начала промывки, что исключает обратное смешивание основной массы жидкости с предыдущей жидкостью, кроме того, что задерживается на смоле после слива. (2) Слой смолы псевдооживают во время реакции, так что он становится плоским и не содержит каналов в начале промывки. (3) Реактор заполняют жидкостью не полностью, поэтому гравитация обеспечивает полное радиальное распределение растворителя поверх слоя смолы. (4) Промывки разделяют на несколько промывочных загрузок меньшего объема, что обеспечивает улучшение движения в режиме поршневого потока с меньшим обратным смешиванием. (5) Интегрированная в процесс многократная промывка обеспечивает возможность гораздо более эффективного использования растворителя для промывки. Только «самый грязный» растворитель для промывки выходит из системы в отходы после каждой реакции, а подача нового чистого растворителя требуется только для сегментов заключительной промывки.

#### 15 Сочетание:

На этапе сочетания фосфорамидит и активатор перекачивают в зону амидита, смешивают в этой зоне, прокачивают связующий раствор в зону подачи и затем в реактор, псевдооживают связующий раствор в реакторе в течение заданного пользователем периода времени, в течение, например, 10 минут, затем вытесняют реакционный раствор из реактора так, чтобы обеспечить его полное сливание в отходы. В частности, закачать указанный амидит (200 мл) в зону активации амидита и прокачать его азотом. Закачать раствор активатора (200 мл) в зону активации амидита и прокачать азотом. Перемешать, затем прокачать полученную смесь в зону подачи, а затем в реактор для инициации реакции сочетания на смоле. Выполнять периодическое псевдооживление смолы в реакторе в течение всего времени реакции сочетания (10 или 15 минут), примерно раз в 45 секунд, барботируя азот через дно реактора со смолой, каждый раз в течение 15 секунд. Например, при использовании амидита номер 4, автоматизированная система выполняет следующее. Открыть выпускной вентиль 1142, открыть вентиль 1104А, включить насос № 1104. Закачать указанную пользователем массу (200 мл). Система управления отслеживает изменение массы по массе питающей емкости, чтобы отмерить правильное количество. По окончании закачки закрыть вентиль 1104А и открыть вентиль 1104В, чтобы прокачать сырьевой раствор амидита в зону амидита с помощью азота. Повторить то же самое для активатора. Открыть выпускной вентиль 1142, открыть вентиль 1120А, включить насос 1120 для загрузки указанной пользователем массы (200 мл), затем закрыть вентиль 1120А и открыть вентиль 1120В для подачи азота в зону амидита. Открыть вентиль 1143 для

выкачивания азота из зоны подачи в зону амидита для смешивания активатора с амидитом. Прокачать связующий раствор в зону подачи, открыв вентиль 1141 и открыв вентиль 1143, закрыв выпускной вентиль 1142 открыв выпускной вентиль 1152. Прокачать связующий раствор из зоны подачи в реактор, закрыв выпускной вентиль 1152, закрыв вентиль 1143, открыв вентиль 1151 подачи азота. Вентиль 1145 направить в сторону распылительного конуса. Тщательно перемешать реакционную смесь, открыв выпускной вентиль 1152, открыв вентиль 1153, открыв вентиль 1158 и обеспечив барботажа азота через дно реактора и через выпускное отверстие из зоны подачи. Попеременно прокачивать жидкость вниз через смолу, а затем вверх из смолы с потоком азота с заданной пользователем частотой. Также допустимо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение всего времени реакции. При прокачивании вниз выпускной вентиль 1152 закрыт, вентиль 1151 подачи азота открыт, и вентиль 1153 закрыт. При прокачивании вверх вентили находятся в противоположном положении, так что азот может поступать в нижнюю часть реактора и выходить через выпускное отверстие. По окончании сочетания выполнить откачку в отходы. Это означает, что система закрывает вентиль 1152, открывает вентиль 1151 подачи азота, открывает вентиль 1153, открывает вентиль 1155. Вентиль 1154 направлен в сторону вентилей 1160, вентиль 1160 направлен в сторону вентилей 1157, вентиль 1157 направлен в отходы. Затем открыть вентиль 1104А и включить перистальтический насос 1104 в обратном направлении примерно на 1 мл, чтобы удалить раствор реагента из тупикового участка и свести к минимуму вероятность попадания амидита 4 в зону амидита во время другого цикла.

**Промывка линии подачи методом вытеснения после реакции сочетания:**

Это продолжение примера, в котором был использован вентиль 1104 подачи амидита. Открыть вентиль 1104С, открыть выпускной вентиль 1142, закачать заданное пользователем количество растворителя АСН с помощью насоса 1130 (100 мл). Затем закрыть вентиль 1104С и открыть вентиль 1104В, чтобы направить растворитель в зону амидита под давлением азота. Закрывать выпускной вентиль 1142, открыть вентиль 1141, открыть вентиль 1143, открыть выпускной вентиль 1152 и прокачать промывочный растворитель в зону подачи. Затем прокачать промывочную жидкость в реактор через распылительный конус, создать давление в реакторе, закрыв вентили 1143 и 1152, открыв вентили 1151 и откачав промывочный раствор из нижней части реактора в отходы.

**Окисление: (если требуется вместо сульфирования):**

Загрузить 0,05 М раствор йода (530 мл) в зону подачи, прокачивая его азотом, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать раствор в реактор для инициации реакции окисления на смоле. Выполнять периодическое псевдооживление реактора в течение всего

времени окисления (~4 минуты), примерно раз в 30 секунд, барботируя азот через дно реактора со смолой, каждый раз в течение 12 секунд. Также допустимо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение всего времени реакции. Начать откачивать окислительный раствор через слой смолы со скоростью 540 мл/мин в течение 65 секунд.

5 Прокачать оставшийся окислительный раствор для сливания в отходы через дно фильтра. Более конкретно, загрузить раствор йода в зону подачи, открыв выпускной вентиль 1152, открыв вентиль 1123А и перекачивая насосом 1123 до достижения заданной пользователем массы раствора йода. Система управления использует массу противовеса для питающей емкости с йодом для подачи правильного количества. После достижения требуемой массы

10 загруженного йода закрыть вентиль 1123А и открыть вентиль 1123В, чтобы прокачать йод азотом из линии подачи в зону подачи. Закрыть выпускной вентиль 1152, открыть вентиль 1151 подачи азота, направить вентиль 1145 в сторону распылительного конуса и подождать указанное пользователем время для прокачивания йода из зоны подачи в реактор поверх смолы (около 10 секунд). Открыть вентиль 1159 и включить насос 1159 на достаточное

15 время, чтобы откачать около 20 мл ацетонитрила, который был вытеснен со дна реактора при прокачивании йода через смолу. Продолжать выполнение реакции окисления в периодическом режиме посредством неоднократного псевдооживления слоя смолы в растворе йода, аналогично тому, как это было сделано для реакции сочетания. Однако следует использовать более интенсивное барботирование азота, открывая вентиль 1156

20 подачи азота в дополнение к вентилю 1158 во время псевдооживления. Следует обратить внимание, что вентиль 1156 обеспечивает более высокий расход азота, а вентиль 1158 — более низкий расход азота, в соответствии с настройками и значениями CV дозирующих вентилях. Чередовать прокачивание йода через смолу и барботирование азота через смолу для псевдооживления в течение заданного пользователем времени и с использованием

25 указанной частоты в течение требуемой продолжительности реакции окисления, например, 4 минуты. Также допустимо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение всего времени реакции. По истечении времени окисления в псевдооживленном слое раствор йода откачивают в отходы. Для этого открыть вентиль 1151 подачи азота, открыть вентиль 1159, направить вентиль 1154 по направлению к вентилю 1160, направить вентиль 1160 по

30 направлению к вентилю 1157, направить вентиль 1157 в отходы. Включить насос 1159, чтобы откачать отходы. По истечении требуемого времени откачки закрыть вентиль 1151 подачи азота, открыть вентиль 1153, открыть вентиль 1155 и подождать, пока давление в зоне подачи не упадет ниже заданного пользователем значения (упадет с 15 фунтов/кв.дюйм изб. до 9 фунтов/кв.дюйм изб.), что обеспечивает полное вытеснение

35 жидкости в отходы и прокачивание азотом. Открыть вентиль 1123А и включить насос №

1123 в обратном направлении примерно на 1 мл. Это поможет очистить тупиковый участок от реагента и обеспечить чистоту последующего прохода по линии подачи, чтобы в линии подачи не осталось йода и не было возможности попадания капель йода в зону подачи при выполнении других стадий.

5 **Интегрированная в процесс многократная промывка после окисления:**

Интегрированная в процесс многократная промывка после окисления очень похожа на интегрированную в процесс многократную промывку после деблокирования кислотой, за исключением того, что в ней используют только три бутылки: А2, В2 и С2. Детали оборудования показаны на фиг. 13. Бутылку А2 используют первой, и промывочный растворитель из нее прокачивают через слой смолы реактора в отходы. Затем используют растворитель из бутылки В2 для промывки реактора, и прокачивают этот через слой смолы в бутылку А2. И так далее. По окончании интегрированной в процесс многократной промывки бутылки А2 и В2 заполнены, а бутылку С2 пуста. Бутылку С2 повторно наполняют промывочной жидкостью для стенок реактора, промывочной жидкостью для вытеснения и промывочной жидкостью для амидитной зоны, как описано далее.

К циклу № 9 противоточная промывочная жидкость из бутылей А2, В2, С2 содержала примерно 450 мл (450 мл свежего АСN, поступающего в бутылку С2 после вытеснения с использованием 100 мл после реакции сочетания, 100 мл промывочной жидкости для стенок реактора и 50 мл для промывки линии подачи методом вытеснения, 100 мл промывочной жидкости для амидитной зоны и 100 мл для промывки в режиме поршневого потока). Общий объем промывочного растворителя, протекающего через смолу для всех промывок после окисления, составлял примерно 1800 мл. Однако в систему было загружено только 450 мл свежего ацетонитрила. Остальное представлял собой повторно используемый АСN из бутылей А2, В2, С2. Такая интегрированная в процесс многократная стратегия промывки делает промывку более эффективной. Образцы отбирали после последней промывки на протяжении всего цикла, от цикла 1 до цикла 21, и все образцы, измеренные с помощью ЯМР, содержали >99,9% АСN, что примерно соответствует значению, получаемому в синтезаторе Cytiva в конце промывки, но для Cytiva необходимо в 7 раз больше промывочного растворителя на ммоль, если сравнивать промывочный растворитель, используемый для Cytiva, после суммирования процессов сочетания и окисления. Конечные промывки после сульфирования, по данным ЯМР, также содержали >99,9% АСN.

**Промывка стенок реактора после окисления:**

Открыть выпускной вентиль 1152, открыть вентиль 1130В, открыть FCV2 до тех пор, пока требуемая масса растворителя не окажется в зоне подачи (50 мл). Растворитель

поступает в зону подачи через спрейбол, обеспечивая орошение стенок в зоне подачи. Закрывать вентиль 1130В, открыть вентиль 1151 подачи азота, направить вентиль 1145 в сторону распыления на стенки, обеспечивая орошение стенок реактора. Закрывать вентиль 1151 подачи азота, открыть выпускной вентиль 1152, повторить описанные стадии для загрузки дополнительного количества промывочного растворителя (50 мл), одновременно орошая стенки зоны подачи и стенки реактора. Псевдооживление растворителя и смолы в реакторе на данной стадии является необязательным, по выбору пользователя; в данном эксперименте псевдооживление не проводили. Открыть вентиль 1151 подачи азота, открыть вентиль 1159. Вентиль 1154 направлен к вентилю 1160, вентиль 1160 направлен к вентилю 11300. Открыть вентиль 11304, включить насос 1159 и прокачать промывочный растворитель через реактор в бутылку С2. По окончании времени откачки открыть вентиль 1153, открыть вентиль 1155 и закрыть вентиль 1151 подачи азота. Продолжать прокачивание до достижения заданного пользователем давления в зоне подачи (давление упадет с 15 фунтов/кв.дюйм изб. до 9 фунтов/кв.дюйм изб.), чтобы убедиться, что весь растворитель вытеснен из реактора в бутылку С2.

**Промывка линии подачи после окисления методом вытеснения:**

Открыть выпускной вентиль 1152, открыть вентиль 1123С, включить насос 1130, закачать указанную массу растворителя в зону подачи (50 мл). Закрывать вентиль 1123С, открыть вентиль 1130В для прокачивания растворителя в зону подачи. Вентиль 1145 направлен в сторону распылительного конуса для равномерного распыления поверх слоя смолы и поддержания плоскостности слоя смолы. Открыть вентиль 1151 подачи азота для прокачивания промывочного растворителя в реактор. Открыть вентиль 1159, вентиль 11300 и вентиль 11304. Направить вентиль 1154 к 1160, направить вентиль 1160 к вентилю 11300. Прокачать растворитель через реактор для промывки и в бутылку С2. По истечении времени откачки закрыть вентиль 1151 подачи азота, открыть вентиль 1153, открыть вентиль 1155 и обеспечивать возможность вытеснения остаточного растворителя из реактора в бутылку С2 до тех пор, пока давление в зоне подачи не станет ниже установленного пользователем значения (упадет с 15 фунтов/кв.дюйм изб. до 9 фунтов/кв.дюйм изб.).

**Промывка амидитной зоны.**

Выполняют после окисления (или сульфирования), чтобы удвоить действие промывочного растворителя, поскольку такой процесс обеспечивает смывание небольших остаточных капель со стенок амидитной зоны, а также накопление большего количества промывочного растворителя, не содержащего йода, пиридина и воды, в бутылку С2 для следующего фосфорамидитного цикла. Открыть вентиль 1130Е и включить насос 1130 для подачи АСN в промывочную бутылку (100 мл). Выключить насос 1130 и закрыть вентиль

1130E. Открыть выпускной вентиль 1142 и открыть вентиль 1130F, прокачать растворитель в зону амидита через спрейбол для тщательного орошения всех поверхностей внутри зоны и смывания капель предыдущего амидита. Воздух от соленоида к вентилю 1130F также обеспечивает привод для вентиля подачи азота в верхней части промывочной емкости, так что азот создает давление в промывочной емкости в то же самое время, когда открывается вентиль 1130F. Вентиль 1130F представляет собой 3-ходовой вентиль, который не может быть открыт для выпуска. Закрывать выпускной вентиль 1142, закрыть вентиль 1130F (закрывание вентиля 1130F также приводит к переключению вентиля подачи N<sub>2</sub> в верхней части промывочной емкости обратно на выпуск), открыть вентиль 1141, открыть вентиль 1143, открыть выпускной вентиль 1152. Это приводит к вытеснению всего промывочного растворителя в зону подачи в течение заданного пользователем времени (например, 5 секунд). Закрывать вентили 1141, 1143, 1152 и открыть вентиль 1151 подачи азота. Открыть вентиль 1159, установить вентиль 1154 по направлению к вентилю 1160, вентиль 1160 по направлению к вентилю 11300, открыть вентиль 11300 и открыть вентиль 11304. Включить насос 1159, прокачать промывочный растворитель через слой смолы в бутылку C2 в течение заданного пользователем времени. В конце откачки открыть вентиль 1153 и вентиль 1155, закрыть вентиль 1151 подачи азота, обеспечить возможность вытеснения остаточного растворителя под давлением азота из реактора в бутылку C2. Подождать, пока давление в зоне подачи не упадет ниже заданного пользователем значения, что подтверждает, что весь растворитель вытеснен из реактора в бутылку C2.

**Промывка после окисления в режиме поршневого потока:**

Выполнить промывку в режиме поршневого потока, как описано выше, но заливать промывочный растворитель в бутылку C2 (100 мл).

**Реакция кэпирования:**

Загрузить кэпирующий раствор А и кэпирующий раствор В (по 100 мл каждого) в зону подачи, вытесняя их азотом, чтобы очистить питающие трубки. Прокачать раствор в реактор для инициации реакции кэпирования на смоле. Выполнить псевдооживление смолы в реакторе 2 раза, барботируя азот через дно реактора со смолой, каждый раз в течение 12 секунд. Общее время обоих псевдооживлений составляет примерно 1 минуту. Также приемлемо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение 1 минуты. Начать прокачивание реакционного раствора через слой смолы со скоростью 200 мл/мин в течение примерно 1 минуты. Откачать остаточный реакционный раствор из нижней части фильтра. Конкретные последовательности автоматизации для стадии кэпирования аналогичны автоматизации стадии окисления, за исключением того, что кэпирующие реагенты поступают через вентиль 1121А и вентиль 1122А с использованием вентиля 1121В, 1122В,

1121С, 1122С для вытеснения азотом и вытеснения растворителем, как описано на стадии окисления.

В другом варианте реализации синтезатора используют три интегрированные в процесс многократные промывочные бутылки, А, В и С, также для промывки после кэпирования. Однако в этом эксперименте промывочные растворы после кэпирования отправляли прямо в отходы.

**Реакция сульфирования (тиолирования) (если требуется вместо окисления):**

Загрузить 0,2 М раствор гидрида ксантана (650 мл) в зону подачи, прокачивая его азотом для очистки питающих трубок. Прокачать раствор в реактор для инициации реакции сульфирования на смоле. Выполнить периодическое псевдооживление смолы в реакторе в течение всего времени псевдооживления при сульфировании (~8 минут), примерно раз в 30 секунд, барботируя азот через дно реактора со смолой, каждый раз в течение 12 секунд. Также допустимо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение всего времени реакции. Начать откачивание раствора гидрида ксантана через слой смолы со скоростью 700 мл/мин в течение 60 секунд. Прокачать оставшийся раствор гидрида ксантана для сливания в отходы через дно фильтра. Подробные последовательности автоматизации для стадии сульфирования аналогичны автоматизации для стадии окисления, за исключением того, что раствор гидрида ксантана закачивают с помощью насоса № 1124 и с использованием вентилях 1124А, 1124В и 1124С. В первых двух циклах и в последних трех циклах использовали сульфирование. После первых двух циклов убрали бутылки А2, В2 и С2 и заменяли их на новые бутылки А2, В2 и С2, каждая из которых была наполнена примерно 400 мл свежего АСN. Затем, перед последними тремя циклами, убрали бутылки А2, В2 и С2 и заменяли их на старые бутылки А2, В2 и С2, все еще наполненные промывочным растворителем АСN, содержащим гидрид ксантана, из первых двух циклов. Это обусловлено тем, что в данном эксперименте было решено не использовать промывочный растворитель АСN, содержащий гидрид ксантана, для промывки после окисления, и наоборот.

Подобно промывке после окисления, общий объем промывочного растворителя, проходящего через смолу для всех промывок после сульфирования, составлял примерно 1800 мл. Однако в систему было загружено только 450 мл свежего ацетонитрила. Остальное представлял собой повторно используемый АСN из бутылок А2, В2, С2. Опять же, такая интегрированная в процесс стратегия многократной промывки делает промывку более эффективной.

**Последний цикл:**

Последний амидит (MeMOP) не имеет защитной группы DMT в 5'-положении, поэтому для него не требуется окончательное деблокирование. После завершения последнего сочетания MeMOP, промывки, сульфирования и промывки, выполняли промывку раствором ДЭА. Загрузить раствор ДЭА (500 мл) в зону подачи. Закачать раствор DEА в зону подачи с помощью азота для очистки питающих трубок. Прокачать раствор в реактор. Дважды выполнить псевдооживление слоя смолы для достижения полного контакта между жидкостью и твердым веществом и повторного осаждения слоя смолы. Общее время обоих псевдооживлений составляет примерно 1 минуту. Также приемлемо постоянное, а не периодическое псевдооживление в течение 1 минуты. Начать прокачивать раствор ДЭА через слой смолы со скоростью 100 мл/мин в течение 600 секунд. Одновременно выполнить параллельное закачивание дополнительного количества раствора ДЭА (500 мл) в зону подачи, чтобы он поступал в верхнюю часть реактора примерно с той же скоростью, с которой его откачивают. Закачать раствор DEА в зону подачи с помощью азота для очистки питающих трубок. Всего за 600 секунд через слой смолы прокачивают 1 л. Откачать остаточный раствор ДЭА в отходы из нижней части фильтра. Повторить процедуру обработки ДЭА еще раз.

Тщательно промыть ACN следующим образом. Для всех указанных промывок ACN после ДЭА использовали свежий ACN из питающей емкости и откачивали из реактора в отходы. Следует использовать 200 мл ACN для промывки линии подачи DEА и промывки слоя смолы в режиме поршневого потока, аналогично другим промывкам, описанным ранее в предложенном способе. Выполнить три промывки в режиме поршневого потока, используя по 150 мл ACN, с применением той же процедуры, что и для промывки в режиме поршневого потока, как описано ранее. Промыть стенки реактора, используя 50 мл ACN, как описано ранее («промывка стенок реактора»). Выполнить две промывки в режиме поршневого потока, используя по 150 мл ACN, с применением той же процедуры, что и для промывки в режиме поршневого потока, как описано ранее.

**Сушка:** выгрузить смолу из реактора. Перенести на однопластинчатый фильтр. Высушить посредством продувания слоя смолы азотом в течение 5-6 часов. Общая масса выгруженной сухой смолы после взятия образца массой ~3 г составила 115,7 г.

Отбирали небольшой образец для отщепления и снятия защиты и СВЭЖХ. Результаты включены в таблицу 17, где представлены результаты СВЭЖХ для примеров с 6 по 10 и сравнение с Cytiva АКТА. Чистота составляла 77,89% FLP. Это немного ниже, чем в других примерах, полученных в реакторе с псевдооживленным слоем, представленных в таблице, но на это есть особая причина. Было случано получено небольшое количество кислоты в линиях подачи связующего раствора в цикле 19. Это

вызвало большее, чем обычно, усечение 19-мера, как показано в таблице. Вследствие указанной ошибки, значение FLP было примерно на 1,5% ниже. Если бы этого не случилось, предполагаемое значение FLP для данного цикла составило бы 79-80%. Данные о выходе и чистоте для этого эксперимента приведены в таблице 17.

5           Выполняли отщепление и снятие защиты (C/D) в двух партиях, используя примерно половину связанного со смолой неочищенного продукта в каждой партии. Для каждой из двух партий C/D выполняли путем смешивания смолы с 28% водным раствором гидроксида аммония (30 мл/г смолы) и нагревания до 38 °С в закрытом сосуде в течение 18-20 часов. В сосуд высокого давления с резьбой Асе объемом 1850 мл, оснащенный манометром, 10 предохранительным клапаном сброса давления 25 фунтов/кв.дюйм изб., термпарой, нагревательной рубашкой и магнитной мешалкой, загружали защищенный ANGPTL3 AS и гидроксид аммония (28% мас.) в воде (1,68 л, 2000 г, 10000 ммоль). Тонкую суспензию герметично закрывали и перемешивали при нагревании до 38 °С в течение ночи. Загружали 58,43 г связанного со смолой продукта в первую партию, а 56,91 г связанного со смолой 15 продукта загружали во вторую партию.

Через 18 часов при 38 °С выключали нагрев и устанавливали баню с ледяной водой, чтобы охладить реактор до температуры ниже комнатной. Смоле давали отстояться и разбавляли взвешенную аликвоту надосадочной жидкости взвешенным количеством воды Mill-Q. Каждую партию анализировали с помощью СВЭЖХ. Партия 1 имела значение FLP 77,6%, 20 а партия 2 - значение FLP 78,4%. Усечение 19-мера составляло 2% в обеих партиях, как объяснялось ранее. Фильтровали основной объем раствора для удаления отработанной смолы. Промывали отработанную смолу из каждой партии 3 x 150 мл смеси 1:1 EtOH:H<sub>2</sub>O. На этот раз аммиак удаляли не в ротационном испарителе, а удаляли его вместе с 25 побочными продуктами C/D с помощью TFF. Полученная масса неочищенного продукта составила 27,52 г из партии 1 и 28,07 г из партии 2. Полученный материал подвергали предварительной обработке методом хроматографической очистки, которая выходит за рамки настоящего документа.

30           **Пример 10: Полупромышленный синтезатор с псевдооживленным слоем с интегрированной в процесс многократной промывкой.**

Пример 10 был очень похож на пример 9. Однако в примере 10 интегрированную в процесс многократную промывку выполняли также после кэпирования. Пример 10 продемонстрировал наименьшее количество промывочного растворителя ACN в мл/ммоль среди всех примеров.

Получали такую же бессмысленную нить AngPTL3 (фиг. 10) в модифицированной версии системы реактора с псевдооживленным слоем из примера 10.

5' MeMOP\*fG\*fU\*fAfUmA fAmCmC fUmUmC mCfAmUmUmUmUmGmA\*mG\*mG3'

Синтез этой молекулы с использованием способа с псевдооживленным слоем по настоящему изобретению описан в настоящем документе и включает стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования) и кэпирования для последовательного введения оставшихся фосфорамидитов.

К концу эксперимента высота слоя смолы, смоченной ацетонитрилом, достигала 5 см и в сухом состоянии - 4 см. Максимальная высота слоя смолы, равная 6 см, была достигнута во время нисходящих фаз на последней стадии деблокирования. Максимальный перепад давления через слой смолы во время эксперимента составлял 15 фунт/кв.дюйм изб. (103,4 кПа изб.), поскольку это было давление подачи азота, используемого для прокачивания жидкости через слой смолы. Для реакций сочетания использовали два эквивалента амидита, за исключением последнего цикла. Для связывания амидита MeMOP использовали 2,1 экв. Общие условия синтеза приведены в таблице 28. Время деблокирования и объем свежего раствора DCA от начала до конца синтеза приведены в таблице 29.

Таблица 28. Условия синтеза для примера 10.

Элемент	Значение	Единицы
Загрузка смолы	249	мкмоль/грамм
Исходное количество смолы	40,18	грамм
Масштаб синтеза	10,00	ммоль
Концентрация амидита	0,1	М в ацетонитриле
Количество эквивалентов амидита	по 2 каждого, кроме MeMOP (2,1 экв. MeMOP)	экв.
Концентрация активатора	0,5	М в ацетонитриле
Количество эквивалентов активатора	10	экв.
Раствор амидита, количество на один цикл	200	мл
Раствор активатора, количество на один цикл	200	мл
Время реакции сочетания	15 (циклы с 8, 12, с 15 по 21) 10 (все остальные циклы)	мин
Количество эквивалентов йода	2,1 (циклы с 3 по 4) 2,65 (циклы с 5 по 18)	экв.
Раствор окислителя, количество на один цикл	420 (циклы с 3 по 4) 530 (циклы с 5 по 18)	мл
Время окисления	5	мин
Количество эквивалентов сульфорирующего реагента	13	экв.
Сульфорирующий раствор, количество на один цикл	650	мл
Время сульфирования	10	мин
Кэпирующий раствор А, количество на один цикл	100	мл
Кэпирующий раствор В, количество на один цикл	100	мл
Время кэпирования	4	мин

Таблица 29. Время деблокирования и объем свежего раствора DCA от начала до конца синтеза для примера 10.

цикл	амидит	объем 3% раствора DCA (мл)	время прокачивания в режиме поршневого потока для деблокирования (минуты)
1	MG-S	1080	8,3
2	MA-S	1200	8,3
3	MG	1256	8,3
4	MU	1312	8,3
5	MU	1368	9
6	MU	1424	9
7	MU	1480	9
8	FA	1536	9
9	MC	1592	9
10	MC	1648	9,7
11	MU	1704	9,7
12	FU	1760	9,7
13	MC	1816	9,7
14	MC	1872	9,7
15	FA	1928	9,7
16	MA	1984	9,7
17	FU	2040	9,7
18	FA	2096	9,7
19	FU-S	2152	9,7
20	FG-S	2208	9,7
21	MEMOP-S	2264	9,7

5 Реагенты и номера партий, использованные для примера 9, представлены в таблице 30.

Таблица 30. Партии реагентов, использованные для примера 10.

Реагент	Партия
ACN	Fisher 214141
Кэпирующий раствор А, 1-метилимидазол/ACN (20/80 об./об.)	см. ниже
Кэпирующий раствор В, 1:1 смесь В1 и В2. В1 представляет собой 40% об. уксусного ангидрида в ACN. В2 представляет собой 60% об. 2,6-лутидина в ACN	см. ниже
0,2 М гидрида ксантана в смеси ACN/пиридин (70/30 об./об.)	см. ниже
0,05 М йода в смеси пиридин/вода (90/10 об./об.)	см. ниже
Деблокирование, дихлоруксусная кислота (3% DCA/толуол, об./об.)	см. ниже
ДЭА, 20% диэтиламина в ACN (20/80 об./об.)	см. ниже
Реагент-активатор, 0,5 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ACN	DW336-US
Kinovate Nittophase HL 2'OMeG(iBu) 250, 249 мкмоль/г	H08023

Все растворы амидитов были получены с использованием ACN производства Fisher, партия № 212215. Растворяли амидиты в растворителе ACN следующим образом. Смешивали до растворения. В герметично закрываемые флаконы добавляли сухие набивки из молекулярных сит.

5 Используемые партии ACN: EMD, партия № 52261, EMD, партия № 52261, Fisher, № 214141

	Требуемые амидиты:	Требуемый растворитель:
	mA 45,91 г	517 мл
	mC 76,74 г	957 мл
10	mG 44,98 г	517 мл
	mU 89,55 г	1177 мл
	fA 64,56 г	737 мл
	fG 25,48 г	297 мл
	fU 55,19 г	737 мл
15	MeMOP, 16,53 г	297 мл

Молекулярные массы амидита были следующими:

	фосфорамидит mA DMT-2'-O-MeA(bz), MM 887,97
	фосфорамидит mC DMT-2'-O-MeC(Ac), MM 801,87
20	фосфорамидит mG DMT-2'-O-MeG(iBu), MM 869,95
	фосфорамидит mU DMT-2'-O-MeU-CE, MM 760,82
	фосфорамидит fA DMT-2'-F-dA(bz), MM 875,93
	фосфорамидит fC DMT-2'-F-dC(Ac), MM 789,84
	фосфорамидит fG DMT-2'-F-dG(iBu), MM 857,9
25	фосфорамидит fU DMT-2'-F-dU-CE, MM 748,8
	MeMOP, MM 556,5

Получали следующие растворы реагентов:

Кэпирующий раствор В1:

30 Уксусный ангидрид: Macron Fine Chemicals, партия № 0000239131

Ацетонитрил: Fisher, партия № 214141

В бутль загрузжали 481 мл уксусного ангидрида и 722 мл ацетонитрила.

Кэпирующий раствор В2:

35 2,6 - Лутидин: Acros, партия № A0428332

Ацетонитрил: EMD, партия № 52261

В бутылку загружали 722 мл лутидина и 481 мл ацетонитрила.

Кэпирующий раствор А:

- 5 1-Метилимидазол: Alfa Aesar, партия № 5009J24W  
Ацетонитрил: Fisher, партия № 214141  
Загружали 481 мл имидазола. Загружали 1924 мл ACN.

Сульфурющий раствор, 0,2 М гидрида ксантана:

- 10 Гидрид ксантана: TCI, партия № QLXKC-LI  
Пиридин: Fishers, партия № 212147  
Загружали 3775 мл пиридина. В бутылку с пиридином загружали 114 г ХН. Смешивали до растворения.

15 Окислительный раствор:

Раствор йода (0,05 М)  
Honeywell, партия № EA702-US  
В питающий бак загружали ~8 кг исходного раствора из кега.

20 Раствор активатора:

Honeywell, партия № EA713-US  
В питающий бак загружали ~4,3 кг исходного раствора из кега.

20% ДЭА в ацетонитриле:

- 25 ДЭА: Sigma-Aldrich, партия № STBJ5069  
ДЭА: Sigma-Aldrich, партия № SHBK7197  
Ацетонитрил: Fisher, партия № 214141  
В бутылку загружали 400 мл ДЭА. В бутылку загружали 1600 мл ACN.

30 3% раствор DCA в толуоле:

DCA: Sigma Aldrich, партия № MKCQ92  
Толуол: Superior, партия № HX11315122

Партия №1

- 35 1. В бутылку загружали 18664 мл толуола

2. В бутылку загружали 577 мл DCA
3. Выливали бутылку в питающую емкость.

#### Партия №2

- 5 1. В бутылку загружали 19516 мл толуола
2. В бутылку загружали 604 мл DCA
3. Выливали бутылку в питающую емкость.

Начинали с mG, связанного известными способами со смолой NittoPhase HL 2'  
10 OMeG(iBu) 250 (249 мкмоль/г) (далее упоминаемого как «mG-смола»), а настройки устройства синтезатора показаны на фиг. 11. Использовали ACN для суспендирования 40,18 г (10,00 ммоль) mG-смолы в реакторе с внутренним диаметром 10,16 см с сетчатым фильтром с 40-микронной фриттой на дне. Начальная глубина смолы составляла примерно 1 см в высоту.

15 Заливали все насосы и линии подачи. Прокачивали ACN через слой молекулярных сит на пути в питающую емкость с инертной атмосферой. ACN и DCA в толуоле подавали из питающих баков под давлением и регулировали автоматическими вентилями управления потоком. Для всех остальных сырьевых потоков использовали перистальтические насосы и питающие емкости. Растворы амидитов хранили отдельно в питающих емкостях,  
20 обозначенных «АМ. 1 л» и присоединенных к перистальтическим насосам, подключенным к вентилям V1101A – V1108A на фиг. 11. Для фосфорамидите MeMOP использовали одну из питающих емкостей АМ. Растворы активатора и ДЭА хранили в питающих емкостях, обозначенных «Актив. 5 гал.» и «ДЭА 1 л», соответственно, на фиг. 11.

Кэпирование не требуется для циклов 2 - 9 (нуклеозиды с 3 по 10). Кэпирование не  
25 требуется после присоединения MeMOP в 21 цикле. Для каждого фосфорамидита, добавленного в синтез, последовательно проводили стадии деблокирования, сочетания, окисления (или сульфирования, если в последовательности имеется связь P=S) и кэпирования, как описано в примере 9, за исключением следующих отличий.

Использовали три дополнительные бутылки емкостью 1 л, бутылки А3, В3 и С3,  
30 вместе с расположенными последовательно автоматическими запорными клапанами для выполнения интегрированной в процесс многократной промывки после кэпирования. Они не показаны на фиг. 11, но аналогичны той части фиг. 11, где показаны бутылки А2, В2 и С2, а также описанию на фиг. 13 бутылки А2, В2 и С2. Все вентили для бутылок А3, В3 и С3 были такими же, как показано на фиг. 13, но они обозначены как элементы серии 400, то  
35 есть вентили 400А, 400В, 400С, 401А, 401В, 401С, 402, 403, 404. Процедура многократной

промывки аналогична процедуре, описанной для промывки после окисления/тиолирования в примере 9. Весь растворитель из промывочной жидкости из бутылки А3 прокачивали через слой смолы в отходы, затем промывочную жидкость из бутылки В3 прокачивали через слой смолы в бутылку А3, а промывочную жидкость из бутылки С3 прокачивали через слой смолы в бутылку В3. Затем выполняли две промывки первичным АСN по 150 мл, каждую из которых прокачивали через слой смолы и перекачивали обратно в бутылку С3. Первые 150 мл обеспечивали очистку трубок подачи реагента в зону подачи, затем промывку слоя смолы в режиме поршневого потока. Вторую промывку объемом 150 мл использовали для орошения стенок зоны подачи, затем для орошения стенок реактора, затем для промывки слоя смолы в режиме поршневого потока. В целом, после предварительного наполнения каждой из бутылок для многократной промывки на 300 мл, для промывки в каждом цикле было использовано в общей сложности 1,3 л свежего АСN. Указанное значение включает 550 мл после деблокирования, 100 мл после сочетания, 350 мл после окисления и 300 мл после кэпирования. Для сравнения, в масштабе 10 ммоль в синтезаторах с насадкой обычно используют около 8-10 л свежего АСN для прокачивания растворителем и промывки растворителем во время каждого цикла. Образцы подтвердили, что каждая из конечных точек промывки была такой же, как и то, что обычно достигается при использовании синтезаторов с уплотненным слоем, т.е. ~99,9% АСN в последней порции промывочного растворителя, выходящего из реактора. Причинами уменьшения количества растворителя в промывочном растворителе АСN на ~85% по сравнению с реакторами с уплотненным слоем являются: реагенты сливают из реактора до промывки, слой смолы осаждается плоским и не имеет каналов за счет псевдооживления во время реакции, промывочный растворитель эффективно распределяют по смоле с помощью конусного распылительного распределителя, промывки разделяют на несколько частей для осуществления движения в режиме поршневого потока, и, что наиболее важно, интегрированная в процесс многократная промывка делает использование промывочного растворителя намного более эффективным. Например, для промывки после деблокирования используют только 550 мл чистого АСN, но общий объем промывочного растворителя, проходящего через реактор во время промывки после деблокирования, составляет 3500 мл. Аналогичным образом, для промывки после окисления/тиолирования используют только 350 мл чистого АСN, но общий объем промывочного растворителя, проходящего через реактор во время промывки после окисления/тиолирования, составляет 1700 мл, при условии, что 100 мл промывочной жидкости после сочетания перекачивают в бутылку С2. Аналогично, для промывки после кэпирования используют только 300 мл чистого АСN, но общий объем промывочного растворителя, проходящего через реактор во время промывки после кэпирования,

составляет 1200 мл. Самое главное, что уменьшение объема промывочной жидкости не меняет конечные точки промывки. Конечные точки промывки в экспериментах с синтезатором с уплотненным слоем, в которых использовали, в целом, 800-1000 мл/ммоль промывочного растворителя ACN за цикл, составляют 99,9% ACN, а конечные точки промывки в синтезаторах с псевдооживленным слоем, в которых использовали, в целом, 130 мл/ммоль промывочного растворителя ACN за цикл, составляют 99,9% ACN. Отличие состоит в том, что промывочный растворитель в реакторе с псевдооживленным слоем, в котором интегрирована многократная промывка, используется намного эффективнее.

Еще одно отличие от примера 9 заключается в том, что в примере 10 промывочный растворитель после сочетания повторно использовали в промывочном растворителе после окисления/тиолирования. Процедуру промывки методом вытеснения после сочетания выполняли следующим образом:

**Промывка линии подачи методом вытеснения после реакции сочетания:**

Это продолжение примера, в котором был использован вентиль 1104 подачи амидита (фиг. 11). Открыть вентиль 1104С, открыть выпускной вентиль 1142, закачать заданное пользователем количество растворителя ACN с помощью насоса 1130 (100 мл). Затем закрыть вентиль 1104С и открыть вентиль 1104В, чтобы направить растворитель в зону амидита под давлением азота. Закрыть выпускной вентиль 1142, открыть вентиль 1141, открыть вентиль 1143, открыть выпускной вентиль 1152 и прокачать промывочный растворитель в зону подачи. Затем прокачать растворитель в реактор вверх смолы через распылительный конус, откачать через смолу, через дно реактора и в бутылку С2. Для этого закрыть выпускной вентиль 1152, закрыть вентиль 1143, открыть вентиль 1151 подачи азота, направить вентиль 1145 к распылительному конусу, открыть вентиль 1159, направить вентиль 1154 к вентилю 1160, направить вентиль 1160 к вентилю 11300, открыть вентиль 11300, открыть вентиль 11304 и выполнить прокачивание с помощью насоса 1159. По истечении заданного пользователем времени откачки закрыть вентиль 1159, открыть вентиль 1153, открыть вентиль 1155 и обеспечить возможность прокачивания остаточной промывочной жидкости под давлением азота в бутылку С2 до тех пор, пока давление в зоне подачи не упадет ниже заданного пользователем значения (упадет с 15 фунтов/кв. дюйм изб. до 9 фунтов/кв.дюйм изб.).

Все остальные части процедуры были такими же, как описано в примере 9, за исключением того, что после кэпирования также осуществляли многократную промывку.

**Сушка:** после последнего цикла, обработки ДЭА и промывки выгружали смолу из реактора. Переносили на однопластинчатый фильтр. Сушили пропусканием азота через

слой смолы в течение 6 часов. Общая масса выгруженной сухой смолы, включая небольшой образец, составила 116,24 г.

Отбирали небольшой образец для отщепления и снятия защиты и СВЭЖХ. Результаты включены в таблицу 17 (результаты СВЭЖХ для примеров с 6 по 10 и сравнение с Cytiva АКТА).

Во всех примерах 6-9 была синтезирована одна и та же цепь. Как описано выше, в примере 6 представлена альтернативная конструкция синтезатора экспериментального масштаба. В новой конструкции отсутствуют зоны подачи реагентов, кроме амидитов и активатора. В ней использовано меньшее количество насосов с несколькими головками, подключенными параллельно, и интегрировано повторное использование растворителя из одного фосфорамидитного цикла в следующий, что снижает объемы промывочного растворителя.

В примере 7 представлена альтернативная конструкция синтезатора в экспериментальном масштабе с интегрированным повторным использованием избытка раствора деблокирующего реагента из одного фосфорамидитного цикла в следующем, что способствует уменьшению объемов кислоты, необходимых для реакции деблокирования. В этом примере использовали 29% раствор DCA, который обычно используется в синтезаторах Cytiva с уплотненным слоем, на ммоль.

В примере 8 представлена новая конструкция реактора для получения в увеличенном масштабе. В новой конструкции реактора в масштабе 10 ммоль используют другую стратегию промывки с большим количеством промывок меньшего размера. Промывки представляют собой комбинацию поршневого потока и псевдооживления, предназначенные для эффективного удаления реагентов. Конусный распылительный распределитель используют для поддержания плоскостности слоя смолы и обеспечения эффективной промывки в режиме поршневого потока. В представленном примере продемонстрировано уменьшение объема промывочного растворителя на 40% на ммоль по сравнению с синтезаторами Cytiva АКТА. В качестве промывочного растворителя перед реакцией деблокирования для предварительного набухания смолы и удаления ACN использовали толуол, что делает реакцию деблокирования более эффективной.

В примере 9 не выполняли промывку толуолом перед деблокированием. Толуол заменяли на повторно используемую кислоту. Самую чистую часть кислотного деблокирующего раствора из одного цикла использовали для предварительного набухания смолы и вымывания ACN из смолы в начале следующего цикла. В примере 9 не выполняли

кэпирование для циклов со 2 по 9. В примере 9 использована интегрированная в процесс многократная промывка после деблокирования, окисления и тиолирования.

5       Пример 10 был похож на пример 9, но также включал использование интегрированной в процесс многократной промывки после кэпирования, и промывочный раствор после реакции сочетания повторно использовали для промывки после окисления/тиолирования. Пример 10 демонстрировал самое низкое количество промывочного растворителя ACN по сравнению со всеми другими примерами, описанными в настоящем документе, и в нем использовали примерно на 85% меньше промывочного растворителя по сравнению с синтезаторами Cytiva АКТА, в пересчете на ммоль.

10       Руководство по всем вариантам реализации реактора с псевдооживленным слоем приведено в таблице 31.

Таблица 31. Руководство по вариантам реализации реактора с псевдооживленным слоем.

Пример	1	2	3	4	6	7	8	9	10
низкое использование реагента DCA						x			
низкое использование растворителя ACN					x		x	x	x
большая высота слоя смолы		x							
более чистая часть раствора деблокирующего реагента повторно используется из одного цикла в следующем						x		x	x
более чистая часть промывочного растворителя повторно используется из одного цикла в следующем					x		x	x	x
интегрированная в процесс многократная промывка								x	x
полупромышленный масштаб							x	x	x
конусный распылительный распределитель							x	x	x
псевдооживление без барботажа инертного газа	x								
реактор проходит в верхнюю секцию большего диаметра		x		x	x	x			
начальные порции промывочного растворителя и/или загружаемые реагенты подвергаются псевдооживлению для уменьшения падения давления, которое в противном случае будет большим		x	x	x					
реакцию деблокирования выполняют совсем без псевдооживления, когда свежий раствор кислоты поступает в реактор, используют только поршневой поток						x		x	x
загрузку реагентов, кроме реагентов для реакции сочетания, разделяют на 2 части: псевдооживленная фаза, за которой следует фаза в режиме поршневого потока				x					
в некоторых циклах пропускают экпирование						x		x	x
перед подачей в реактор загружают реагенты в отдельные зоны подачи	x	x		x		x			
перед подачей в реактор загружают реагенты в общую зону подачи			x				x	x	x
амидит и активатор смешивают в зоне подачи амидита перед переносом в реактор посредством барботирования азота			x			x	x	x	x
реагенты подают непосредственно в реактор, а не в зону подачи					x				
реактор, зона подачи и зона амидита имеют распылительные устройства для промывки стенок							x	x	x
промывочный растворитель после сочетания повторно используют в промывочном растворителе после окисления/тиолирования									x

5 Наложение хроматограмм СВЭЖХ для примеров 1–5 представлено на фиг. 14 и 15, а наложение хроматограмм СВЭЖХ для примеров 6–10 и для «АКТА по сравнению с 1–4» представлено на фиг. 16 и 17. Показано, что профили примесей в экспериментах с синтезатором с псевдооживленным слоем аналогичны профилям примесей в экспериментах с Cytiva АКТА OP100. В экспериментах с синтезатором с псевдооживленным слоем нет

новых примесей, которых нет в экспериментах с Cytiva АКТА OP100. Однако высота слоя смолы в синтезаторе АКТА составляла максимум 2 см в экспериментах с высокой чистотой, тогда как высота слоя смолы в реакторе с псевдооживленным слоем составляла до 30 см. Кроме того, помимо соображений чистоты, синтезатор с псевдооживленным слоем обеспечивает более высокий выход, уменьшение объема промывки растворителем примерно на 85% и меньшее количество эквивалентов DCA по сравнению с АКТА.

Обобщение условий метода ион-парной СВЭЖХ для анализа чистоты антисмысловых нитей в примерах 1-9.

10 Прибор: Waters I-Class Acquity UPLC с бинарным насосом

Колонка: 50 x 2,1 мм Waters ВЕН С18, 1,7 мм, 130 А (номер по каталогу 186003949)

Температура колонки: 55°C

Подвижная фаза А: 10 мМ DIPEA, 100 мМ HFIP в воде.

Подвижная фаза В: ацетонитрил

15 Градиент

- Начальные условия: 99% А / 1% В

- Увеличение содержания В с 1% до 24,3% за 25 мин

- Увеличение содержания В с 24,3 до 100% за 0,1 мин

- Удерживание 100% В в течение 1,9 мин

20 • Уменьшение содержания В с 100% до 1% за 0,1 мин

- Удерживание 1% В в течение 2,9 мин

- Общее время цикла 30 мин

Скорость потока: 0,6 мл/мин

Длина волны: 260 нм

25

### Примеры вариантов реализации

- 5  
10
- Вариант реализации 1. Способ присоединения олигонуклеотида к твердофазной смоле в реакторе со слоем, включающий:
- удаление защитной группы из 5'-положения олигонуклеотида, присоединенного к твердофазной смоле;
  - добавление раствора активированного амидита в реактор со слоем, при этом раствор активированного амидита содержит амидит и течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдооживается при барботировании азота или другом перемешивании, и реагирует в 5'-положении олигонуклеотида, при этом фосфорная линкерная связь, которая присутствует в амидите, содержит атом Р в степени окисления III; и
  - превращение атома Р из степени окисления III в степень окисления V.
- 15  
20  
25
- Вариант реализации 2. Способ по варианту реализации 1, дополнительно включающий стадию добавления кэпирующего раствора до или после превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V, при этом, если связывающий фрагмент не прореагировал с раствором амидита, то кэпирующий раствор кэпирует связывающий фрагмент, так что ни один дополнительный амидит не может быть присоединен к связывающему фрагменту, при этом кэпирующий раствор течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдооживается вместе с гранулами смолы в результате барботирования инертного газа или другого перемешивания, или течет вниз через слой смолы без псевдооживения/смешивания, или часть реакции происходит в псевдооживленном состоянии, и за ней следует часть реакции в режиме поршневого потока.
- 30  
35
- Вариант реализации 3. Способ по варианту реализации 1, дополнительно включающий стадию удаления раствора активированного амидита из реактора со слоем посредством пропускания раствора амидита через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.
- Вариант реализации 4. Способ по варианту реализации 1, дополнительно включающий стадию добавления первого промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление первого промывочного раствора осуществляют после удаления защитной группы.

Вариант реализации 5. Способ по варианту реализации 4, дополнительно включающий стадию добавления второго промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление второго промывочного раствора осуществляют после добавления раствора активированного амидита в реактор со слоем.

5

Вариант реализации 6. Способ по варианту реализации 5, отличающийся тем, что первый и второй промывочные растворы текут вверх и вниз внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию отдельного удаления первого и второго промывочных растворов из реактора со слоем посредством пропускания первого и второго промывочных растворов через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

10

Вариант реализации 7. Способ по варианту реализации 5, отличающийся тем, что добавление второго промывочного раствора осуществляют перед стадией превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V.

15

Вариант реализации 8. Способ по варианту реализации 5, дополнительно включающий стадию добавления третьего промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление третьего промывочного раствора осуществляют после превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V.

20

Вариант реализации 9. Способ по варианту реализации 8, отличающийся тем, что третий промывочный раствор течет вверх и вниз внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию удаления третьего промывочного раствора из реактора со слоем посредством пропускания третьего промывочного раствора через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

25

Вариант реализации 10. Способ по варианту реализации 1, отличающийся тем, что защитная группа представляет собой группу DMT, и удаление защитной группы включает реакцию 5'-положения олигонуклеотида с активирующим раствором, содержащим кислоту в растворителе.

30

Вариант реализации 11. Способ по варианту реализации 10, дополнительно включающий стадию удаления активирующего раствора из реактора со слоем посредством пропускания активирующего раствора через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

35

Вариант реализации 12. Способ по варианту реализации 1, отличающийся тем, что восходящий и нисходящий потоки внутри реактора со слоем осуществляют посредством повышения давления в верхней части реактора для прокачивания вниз и последующего сброса давления в верхней части реактора для прокачивания вверх.

Вариант реализации 13. Способ по варианту реализации 1, отличающийся тем, что смешивание твердых частиц и жидкости в псевдооживленном слое внутри реактора со слоем осуществляют посредством подачи азота или другого газа в нижней части реактора или перемешивания какого-либо другого типа.

Вариант реализации 14. Система для присоединения олигонуклеотида к твердофазной смоле, содержащая реактор со слоем и раствор активированного амидита, при этом раствор активированного амидита содержит амидит и течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдооживляется при барботировании инертного газа или другом перемешивании.

Вариант реализации 15. Система по варианту реализации 14, отличающаяся тем, что реактор со слоем содержит впускное отверстие, обеспечивающее возможность подачи сжатого газа в реактор со слоем, при этом сжатый газ или какой-либо другой тип перемешивания вызывает смешивание раствора амидита с твердыми частицами внутри реактора со слоем.

Вариант реализации 16. Система по варианту реализации 15, отличающаяся тем, что впускное отверстие расположено в нижней части реактора со слоем.

Вариант реализации 17. Система по варианту реализации 14, отличающаяся тем, что реактор со слоем находится под давлением, обеспечиваемым в верхней части реактора со слоем, при этом указанное давление обеспечивает принудительное движение амидита вверх и вниз внутри реактора со слоем.

Вариант реализации 18. Способ по варианту реализации 5, отличающийся тем, что первый и второй промывочные растворы смешиваются внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию отдельного удаления первого и второго промывочных растворов из реактора со слоем посредством пропускания первого и второго промывочных растворов через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

Вариант реализации 19. Способ по варианту реализации 5, отличающийся тем, что промывочный растворитель сливают из нижней части реактора с фильтром перед загрузкой следующего реагента; реагент сливают из нижней части реактора с фильтром перед загрузкой следующего промывочного растворителя; слой смолы перемешивают, чтобы суспендировать частицы смолы в реагентах и/или промывочных растворителях, барботируя инертный газ или обеспечивая восходящее и нисходящее движение жидкости в выбранные моменты времени во время выбранных реакций и/или промывок в каждом цикле.

10 Вариант реализации 20. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что первую часть реагентов загружают в реактор, первую часть подвергают псевдоожигению в начале реакции в течение требуемого времени для достижения полного контакта и достижения набухания смолы, затем первую часть прокачивают через слой смолы в режиме поршневого потока, одновременно загружая вторую часть реагентов в верхнюю часть реактора, так что оставшиеся реагенты проходят через поршневой поток. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10.

Вариант реализации 21. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что последнюю часть раствора деблокирующего реагента повторно используют из одного фосфорамидитного цикла в следующем, что снижает объемы кислоты, необходимые для реакции деблокирования, обеспечивает набухание смолы и повторное оседание слоя без каналов в начале деблокирования, а также смывание ACN перед реакцией в режиме поршневого потока с использованием чистого раствора деблокирующего реагента. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 7, 9 и 10.

25 Вариант реализации 22. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что каждую промывку разделяют на серию из нескольких порций промывки меньшего объема, которые полностью сливают, что может минимизировать обратное смешивание по сравнению с использованием одной большой непрерывной промывки. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10.

Вариант реализации 23. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что некоторые или все промывочные растворители не подвергают псевдоожигению, промывку начинают с фазы псевдоожигения, за которой следует фаза в режиме поршневого потока, или промывка включает фазу псевдоожигения где-либо в середине или конце промывки в

режиме поршневого потока, специально разработанную для эффективного удаления реагентов и в зависимости от того, когда требуется псевдооживление для преодоления перепада давления. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10.

5

Вариант реализации 24. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что поступающие реагенты и промывочные растворители равномерно распределяют радиально по верху слоя смолы с помощью распылительного конуса или другого распределителя для сохранения плоскостности слоя смолы и обеспечения эффективных реакций и промывок в режиме поршневого потока. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 8, 9, 10.

10

Вариант реализации 25. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что более чистую фракцию промывочного растворителя рециркулируют из одного фосфорамидитного цикла и повторно используют в следующем. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 6, 8, 9, 10.

15

Вариант реализации 26. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что после реакций используют интегрированную в процесс многократную промывку, описанную в настоящем документе. Порции растворителя пропускают через реактор несколько раз. Например, шестая промывочная часть растворителя после деблокирования в цикле 1 становится пятой промывочной частью после деблокирования в цикле 2, затем она становится четвертой промывочной частью после деблокирования в цикле 3 и так далее. Интегрированная в процесс многократная промывка обеспечивает возможность гораздо более эффективного использования промывочного растворителя, поскольку после каждой реакции только самые «грязные» части промывочного растворителя выгружают из системы и отправляют в отходы, а подача чистого растворителя требуется только для конечных стадий промывки. Такой вариант реализации продемонстрирован в примере 9, 10.

20

25

Вариант реализации 27. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что реактор имеет нижнюю секцию меньшего диаметра, которая проходит в верхнюю секцию большего диаметра для облегчения псевдооживления при первоначальной подаче реагентов или промывочных растворителей в реактор. Восходящий поток инертного газа проталкивает некоторые или все гранулы смолы вверх в секцию большего диаметра, где

30

жидкость и твердые частицы могут взаимодействовать с меньшим влиянием стенок. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 2, 4, 6, 7.

5  
10  
Вариант реализации 28. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что слой смолы псевдооживают/смешивают с жидким реагентом во время выполнения стадий реакции деблокирования, сочетания, окисления, сульфирования и кэпирования в каждом цикле для достижения полного контакта, а также для уменьшения перепада давления при протекании вниз через слой смолы во время реакции, который в противном случае будет большим. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10.

15  
Вариант реализации 29. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что начальные порции промывочного растворителя псевдооживают для уменьшения перепада давления при протекании вниз через слой смолы во время промывки, который в противном случае будет большим. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 2, 3, 4.

20  
Вариант реализации 30. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что набухание смолы происходит главным образом во время псевдооживления, что уменьшает падение давления при последующем протекании жидкости вниз через слой и выходе из нижней части реактора. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10.

25  
Вариант реализации 31. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что в некоторых циклах отсутствует кэпирование. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 9, 10.

30  
Вариант реализации 32. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что для некоторых реакций не выполняют псевдооживление ни на одной из стадий реакции, а приведение в контакт выполняют только в режиме поршневого потока, например, для деблокирования без псевдооживления, когда загружают чистый раствор DCA. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 7, 9, 10.

35  
Вариант реализации 33. Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что инертный газ проталкивает жидкость вниз через слой смолы, а насос или другое дозирующее устройство на выходе из реактора регулирует скорость потока жидкости через слой. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10.

5      Вариант реализации 34.      Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что растворы амидита и активатора загружают в отдельную зону, необязательно смешивают с барботируемым инертным газом в указанной зоне, затем прокачивают в реактор. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 1, 2, 4, 6, 7.

10     Вариант реализации 35.      Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что растворы амидита и активатора загружают в отдельную зону, необязательно смешивают с барботируемым инертным газом в указанной зоне, а затем перед подачей в реактор прокачивают в зону подачи. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 3, 8, 9, 10.

15     Вариант реализации 36.      Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что реагенты загружают в отдельные зоны подачи перед подачей в реактор. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 1, 2, 4, 7.

20     Вариант реализации 37.      Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что реагенты загружают в общую зону подачи перед подачей в реактор. Такой вариант реализации продемонстрирован в примерах 3, 8, 9, 10.

Вариант реализации 38.      Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что реагенты подают непосредственно в реактор, а не в зону подачи. Такой вариант реализации продемонстрирован в примере 6.

25     Вариант реализации 39.      Способ по варианту реализации 19, отличающийся тем, что промывочный растворитель после реакции сочетания повторно используют в промывочном растворителе после окисления/тиолирования. Такой вариант реализации продемонстрирован в примере 10.

30             Существует множество вариантов реализации, в которых продукт (включая олигонуклеотид) получают любым из способов, и/или процессов, и/или вариантов реализации, описанных в настоящем документе. Например, продукт может быть получен следующим способом:

35             Способ присоединения олигонуклеотида к твердофазной смоле в реакторе со слоем, включающий:

удаление защитной группы из 5'-положения олигонуклеотида, присоединенного к твердофазной смоле;

добавление раствора активированного амидита в реактор со слоем, при этом раствор активированного амидита содержит амидит и течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдооживается при барботировании азота или другом перемешивании, и реагирует в 5'-положении олигонуклеотида, при этом фосфорная линкерная связь, которая присутствует в амидите, содержит атом Р в степени окисления III; и

превращение атома Р из степени окисления III в степень окисления V.

10           Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, который дополнительно включает стадию добавления кэпирующего раствора до или после превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V, при этом, если связывающий фрагмент не прореагировал с раствором амидита, то кэпирующий раствор кэпирует связывающий фрагмент, так что ни один дополнительный амидит не может быть  
15           присоединен к связывающему фрагменту, при этом кэпирующий раствор течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдооживается вместе с гранулами смолы в результате барботирования инертного газа или другого перемешивания, или течет вниз через слой смолы без псевдооживения/смешивания, или часть реакции происходит в псевдооживленном состоянии, и за ней следует часть реакции в режиме поршневого потока.

20           Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, который дополнительно включает стадию удаления раствора активированного амидита из реактора со слоем посредством пропускания раствора амидита через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

              Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, который дополнительно включает стадию добавления первого промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление первого промывочного раствора выполняют после  
25           удаления защитной группы.

              Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, который дополнительно включает стадию добавления второго промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление второго промывочного раствора выполняют после  
30           добавления в реактор со слоем раствора активированного амидита.

              Продукт, полученный указанным выше способом, может быть получен способом, в котором первый и второй промывочные растворы текут вверх и вниз внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию отдельного удаления первого и

второго промывочных растворов из реактора со слоем посредством пропускания первого и второго промывочных растворов через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

5 Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, в котором добавление второго промывочного раствора выполняют перед стадией превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V.

Продукт, полученный указанным выше способом, может быть получен способом, который дополнительно включает стадию добавления третьего промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление третьего промывочного раствора выполняют после превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V.

10 Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, в котором третий промывочный раствор течет вверх и вниз внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию удаления третьего промывочного раствора из реактора со слоем посредством пропускания третьего промывочного раствора через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

15 Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, в котором защитная группа представляет собой группу DMT, и в котором удаление защитной группы включает взаимодействие 5'-положения олигонуклеотида с активирующим раствором, содержащим кислоту в растворителе.

20 Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, который дополнительно включает стадию удаления активирующего раствора из реактора со слоем посредством пропускания активирующего раствора через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

25 Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором восходящий и нисходящий потоки внутри реактора со слоем обеспечивают посредством повышения давления в верхней части реактора для прокачивания вниз и последующего сброса давления в верхней части реактора для прокачивания вверх.

30 Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором смешивание твердых частиц и жидкости в псевдооживленном слое внутри реактора со слоем выполняют посредством подачи азота или другого газа через дно реактора или перемешивания какого-либо другого типа.

35 Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, в котором первый и второй промывочные растворы смешиваются внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию отдельного удаления первого и второго промывочных растворов из реактора со слоем посредством пропускания первого и второго промывочных растворов через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.

Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором промывочный растворитель сливают из нижней части реактора с фильтром перед загрузкой следующего реагента; реагент сливают из нижней части реактора с фильтром перед загрузкой следующего промывочного растворителя; слой смолы перемешивают, чтобы суспендировать частицы смолы в реагентах и/или промывочных растворителях, барботируя инертный газ или используя восходящий и нисходящий поток жидкости в выбранные моменты времени во время выбранных реакций и/или промывок в каждом цикле.

Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, в котором первую часть реагентов загружают в реактор, псевдоожижают первую часть в начале реакции в течение требуемого периода времени для достижения полного контакта и достижения набухания смолы, затем прокачивают первую часть через слой смолы в режиме поршневого потока, одновременно загружая вторую часть реагентов в верхнюю часть реактора, так что оставшиеся реагенты проходят через поршневой поток.

Продукт, полученный указанным выше способом, может быть получен способом, в котором последнюю часть раствора деблокирующего реагента из одного фосфорамидитного цикла повторно используют в следующем, что снижает объемы кислоты, необходимые для реакции деблокирования, обеспечивает набухание смолы и повторное оседание слоя без каналов в начале деблокирования, а также смывание ACN перед реакцией в режиме поршневого потока с использованием чистого раствора деблокирующего реагента.

Продукт, полученный вышеописанным способом, может быть получен способом, в котором каждую промывку разделяют на серию из нескольких порций промывки меньшего объема, которые полностью сливают, что может минимизировать обратное смешивание по сравнению с использованием одной большой непрерывной промывки.

Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором некоторые или все промывочные растворители не подвергают псевдоожижению, промывку начинают с фазы псевдоожижения, за которой следует фаза в режиме поршневого потока, или промывка включает фазу псевдоожижения где-либо в середине или в конце промывки в режиме поршневого потока, специально разработанную для эффективного удаления реагентов и в зависимости от того, когда требуется псевдоожижение для преодоления перепада давления.

Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором поступающие реагенты и промывочные растворители равномерно распределяют радиально поверх слоя смолы с помощью распылительного конуса или другого

распределителя для сохранения плоскостности слоя смолы и обеспечения эффективных реакций и промывок в режиме поршневого потока.

5 Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором более чистую фракцию промывочного растворителя рециркулируют из одного фосфорамидитного цикла и повторно используют в следующем.

10 Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, в котором после реакций используют интегрированную в процесс многократную промывку, описанную в настоящем документе. Порции растворителя пропускают через реактор несколько раз. Например, шестая промывочная часть растворителя после деблокирования в цикле 1 становится пятой промывочной частью после деблокирования в цикле 2, затем она становится четвертой промывочной частью после деблокирования в цикле 3 и так далее. Интегрированная в процесс многократная промывка обеспечивает возможность гораздо более эффективного использования промывочного растворителя, поскольку после каждой реакции только самые «грязные» части промывочного растворителя выгружают из системы и отправляют в отходы, а подача чистого растворителя требуется только для конечных стадий промывки.

20 Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором реактор имеет нижнюю секцию меньшего диаметра, которая проходит в верхнюю секцию большего диаметра для облегчения псевдооживления при первоначальной подаче реагентов или промывочных растворителей в реактор. Восходящий поток инертного газа проталкивает некоторые или все гранулы смолы вверх в секцию большего диаметра, где жидкость и твердые частицы могут взаимодействовать с меньшим влиянием стенок.

25 Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором слой смолы псевдооживают/смешивают с жидким реагентом во время выполнения стадий реакции деблокирования, сочетания, окисления, сульфирования и кэпирования в каждом цикле для достижения полного контакта, а также для уменьшения перепада давления при протекании вниз через слой смолы во время реакции, который в противном случае будет большим.

30 Продукт, полученный описанным выше способом, может быть изготовлен способом, в котором начальные порции промывочного растворителя псевдооживают для уменьшения перепада давления при протекании вниз через слой смолы во время промывки, который в противном случае будет большим.

Продукт, полученный вышеописанным способом, может быть получен способом, в котором набухание смолы происходит главным образом во время псевдооживления, что

уменьшает падение давления при последующем протекании жидкости вниз через слой и на выходе из нижней части реактора.

Продукт, изготовленный вышеописанным способом, может быть получен способом, в котором в некоторых циклах отсутствует кэпирование.

5           Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором для некоторых реакций не выполняют псевдооживление ни на одной из стадий реакции, а приведение в контакт выполняют только в режиме поршневого потока, например, для деблокирования без псевдооживления, когда загружают чистый раствор ДСА.

10           Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором инертный газ проталкивает жидкость вниз через слой смолы, а насос или другое дозирующее устройство на выходе из реактора регулирует скорость потока жидкости через слой.

15           Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором растворы амидита и активатора загружают в отдельную зону, необязательно смешивают с барботируемым инертным газом в указанной зоне, а затем прокачивают в реактор.

20           Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, в котором растворы амидита и активатора загружают в отдельную зону, необязательно смешивают с барботируемым инертным газом в указанной зоне, а затем перед подачей в реактор прокачивают в зону подачи.

Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором реагенты загружают в отдельные зоны подачи перед подачей в реактор.

25           Продукт, полученный вышеуказанным способом, может быть получен способом, в котором реагенты загружают в общую зону подачи перед подачей в реактор.

Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором реагенты подают непосредственно в реактор, а не в зону подачи.

30           Продукт, полученный описанным выше способом, может быть получен способом, в котором промывочный растворитель после реакции сочетания повторно используют в промывочном растворителе после окисления/тиолирования.

Или могут быть получены другие продукты с использованием других способов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ присоединения олигонуклеотида к твердой подложке в реакторе со слоем, включающий:
  - 5 удаление защитной группы из 5'-положения олигонуклеотида, присоединенного к твердой подложке;  
добавление раствора активированного амидита в реактор со слоем, при этом раствор активированного амидита содержит амидит и течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдоожигается при барботировании азота или другом перемешивании, и реагирует  
10 в 5'-положении олигонуклеотида, при этом фосфорная линкерная связь, которая присутствует в амидите, содержит атом Р в степени окисления III; и  
превращение атома Р из степени окисления III в степень окисления V.
2. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию добавления кэпирующего  
15 раствора до или после превращения атома Р из степени окисления III в степень окисления V, при этом, если связывающий фрагмент не прореагировал с раствором амидита, то кэпирующий раствор кэпирует связывающий фрагмент, так что ни один дополнительный амидит не может быть присоединен к связывающему фрагменту, при этом кэпирующий раствор течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдоожигается при  
20 барботировании азота или другом перемешивании, или течет вниз через слой смолы без псевдоожигения/смешивания, или часть реакции происходит в псевдоожигенном состоянии, и за ней следует часть реакции в режиме поршневого потока.
3. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию удаления раствора  
25 активированного амидита из реактора со слоем посредством пропускания раствора амидита через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.
4. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию добавления первого промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление первого промывочного  
30 раствора осуществляют после удаления защитной группы.
5. Способ по п. 4, дополнительно включающий стадию добавления второго промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление второго промывочного раствора осуществляют после добавления раствора активированного амидита в реактор со  
35 слоем.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что первый и второй промывочные растворы текут вверх и вниз внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию отдельного удаления первого и второго промывочных растворов из реактора со  
5 слоем посредством пропускания первого и второго промывочных растворов через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.
7. Способ по п. 5, отличающийся тем, что добавление второго промывочного раствора осуществляют перед стадией превращения атома Р из степени окисления III в степень  
10 окисления V.
8. Способ по п. 5, дополнительно включающий стадию добавления третьего промывочного раствора в реактор со слоем, при этом добавление третьего промывочного раствора осуществляют после превращения атома Р из степени окисления III в степень  
15 окисления V.
9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что третий промывочный раствор течет вверх и вниз внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию удаления третьего промывочного раствора из реактора со слоем посредством пропускания  
20 третьего промывочного раствора через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.
10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что защитная группа представляет собой группу DMT, и удаление защитной группы включает осуществление реакции 5'-положения олигонуклеотида с активирующим раствором, содержащим кислоту в растворителе.  
25
11. Способ по п. 10, дополнительно включающий стадию удаления активирующего раствора из реактора со слоем посредством пропускания активирующего раствора через  
30 фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.
12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что восходящий и нисходящий потоки внутри реактора со слоем осуществляют посредством повышения давления в верхней части реактора во время прокачивания вниз и последующего сброса давления в верхней части реактора во время прокачивания вверх.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что смешивание твердых частиц и жидкости в псевдооживленном слое внутри реактора со слоем осуществляют посредством подачи азота или другого газа в нижней части реактора или перемешивания какого-либо другого типа.
- 5 14. Система для присоединения олигонуклеотида к твердой подложке, содержащая реактор со слоем и раствор активированного амидита, при этом раствор активированного амидита содержит амидит и течет вверх и вниз внутри реактора со слоем или псевдооживляется при барботировании азота или другом перемешивании.
- 10 15. Система по п. 14, отличающаяся тем, что реактор со слоем содержит впускное отверстие, обеспечивающее возможность подачи сжатого газа в реактор со слоем, при этом сжатый газ или какой-либо другой тип перемешивания вызывает смешивание раствора амидита с твердыми частицами внутри реактора со слоем.
- 15 16. Система по п. 15, отличающаяся тем, что впускное отверстие расположено в нижней части реактора со слоем.
17. Система по п. 14, отличающаяся тем, что в реакторе со слоем создают давление и сбрасывают давление в верхней части реактора со слоем, при этом изменения давления вызывают движение амидита вверх и вниз по реактору со слоем.
- 20 18. Способ по п. 5, отличающийся тем, что первый и второй промывочные растворы смешиваются внутри реактора со слоем, и при этом способ дополнительно включает стадию отдельного удаления первого и второго промывочных растворов из реактора со слоем посредством пропускания первого и второго промывочных растворов через фильтр, расположенный на дне реактора со слоем.
- 25 19. Способ по п. 5, отличающийся тем, что промывочный растворитель сливают из нижней части реактора с фильтром перед загрузкой следующего реагента; реагент сливают из нижней части реактора с фильтром перед загрузкой следующего промывочного растворителя; слой смолы перемешивают, чтобы суспендировать частицы смолы в реагентах и/или промывочных растворителях, барботируя инертный газ или обеспечивая восходящее и нисходящее движение жидкости в выбранные моменты времени во время выбранных реакций и/или промывок в каждом цикле.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что первую часть реагентов загружают в реактор, первую часть псевдооживают в начале реакции в течение требуемого времени для достижения полного контакта и обеспечения набухания смолы, затем первую часть прокачивают через слой смолы в режиме поршневого потока, одновременно загружая  
5 вторую часть реагентов в верхнюю часть реактора, так что оставшиеся реагенты проходят через поршневой поток.
21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что последнюю часть раствора деблокирующего реагента из одного фосфорамидитного цикла повторно используют в  
10 следующем, что снижает объемы кислоты, необходимые для реакции деблокирования, обеспечивает набухание смолы и повторное оседание слоя без каналов в начале деблокирования, а также смывание ACN перед реакцией в режиме поршневого потока с использованием чистого раствора деблокирующего реагента.
- 15 22. Способ по п. 19, отличающийся тем, что каждую промывку разделяют на серию из нескольких порций промывки меньшего объема, которые полностью сливают, что может минимизировать обратное смешивание по сравнению с использованием одной непрерывной промывки большого объема.
- 20 23. Способ по п. 19, отличающийся тем, что некоторые или все промывочные растворители не подвергают псевдооживлению, промывку начинают с фазы псевдооживления, за которой следует фаза в режиме поршневого потока, или промывка включает фазу псевдооживления где-либо в середине или в конце промывки в режиме поршневого потока, специально разработанную для эффективного удаления реагентов и в  
25 зависимости от того, когда требуется псевдооживление для преодоления перепада давления.
24. Способ по п. 19, отличающийся тем, что поступающие реагенты и промывочные растворители равномерно распределяют радиально поверх слоя смолы с помощью распылительного конуса или другого распределителя для сохранения плоскостности слоя  
30 смолы и обеспечения эффективных реакций и промывок в режиме поршневого потока.
25. Способ по п. 19, отличающийся тем, что более чистую фракцию промывочного растворителя рециркулируют из одного фосфорамидитного цикла и повторно используют в следующем.

26. Способ по п. 19, отличающийся тем, что после реакций используют интегрированную в процесс многократную промывку, описанную в настоящем документе. Порции растворителя пропускают через реактор несколько раз. Например, шестая промывочная часть растворителя после деблокирования в цикле 1 становится пятой промывочной частью после деблокирования в цикле 2, затем она становится четвертой промывочной частью после деблокирования в цикле 3 и так далее. Интегрированная в процесс многократная промывка обеспечивает возможность гораздо более эффективного использования промывочного растворителя, поскольку после каждой реакции только самые «грязные» части промывочного растворителя выгружают из системы и отправляют в отходы, а подача нового чистого растворителя требуется только для конечных стадий промывки.

27. Способ по п. 19, отличающийся тем, что реактор имеет нижнюю секцию меньшего диаметра, которая проходит в верхнюю секцию большего диаметра для облегчения псевдооживления при первоначальной подаче реагентов или промывочных растворителей. Восходящий поток инертного газа проталкивает некоторые или все гранулы смолы вверх в секцию большего диаметра, где жидкость и твердые частицы могут взаимодействовать с меньшим влиянием стенок.

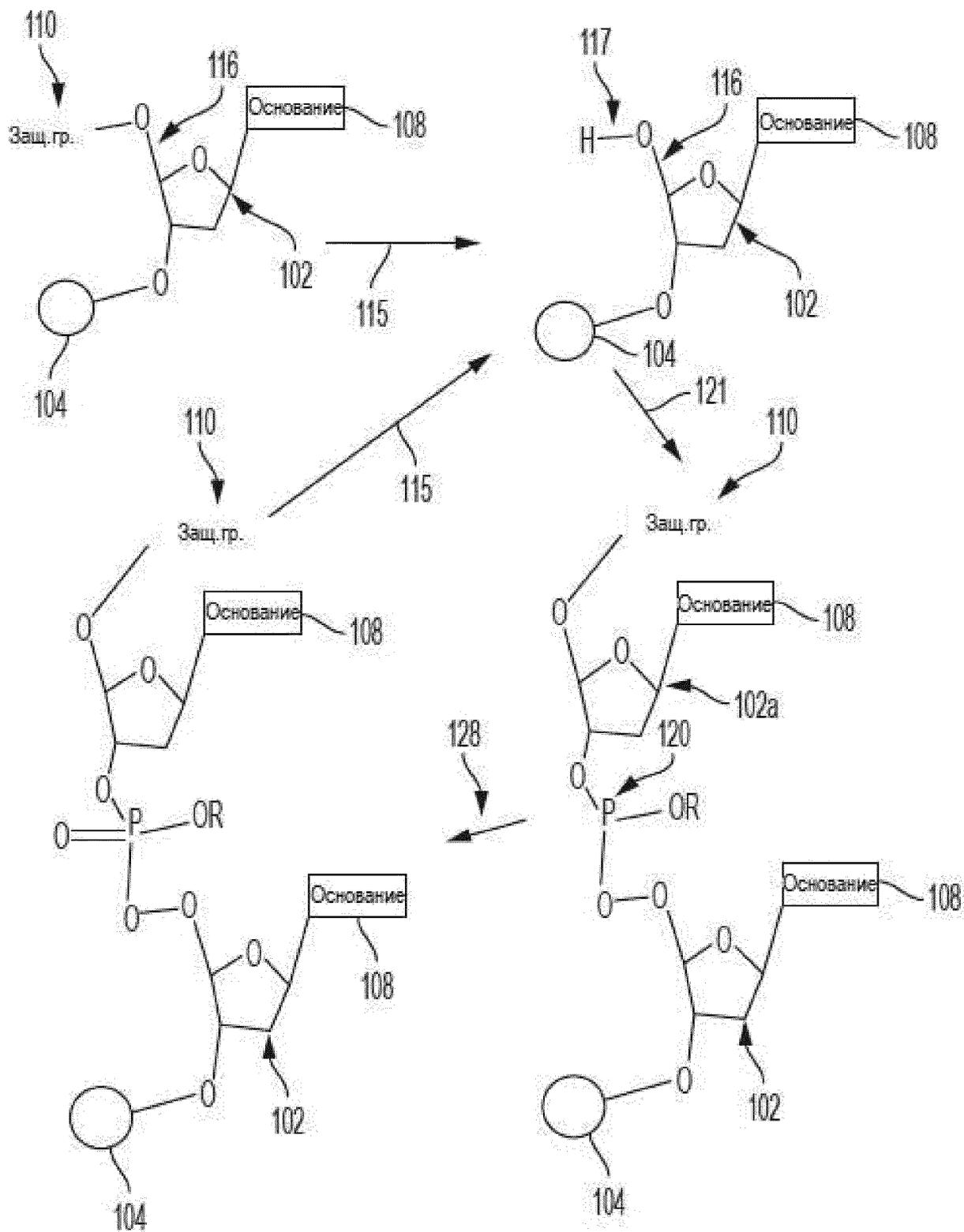
28. Способ по п. 19, отличающийся тем, что слой смолы псевдооживляют/смешивают с жидким реагентом во время выполнения других стадий реакции в каждом цикле для достижения полного контакта, а также для уменьшения перепада давления при протекании вниз через слой смолы во время реакции, который в противном случае будет большим.

29. Способ по п. 19, отличающийся тем, что начальные порции промывочного растворителя псевдооживляют для уменьшения перепада давления при протекании вниз через слой смолы во время промывки, который в противном случае будет большим.

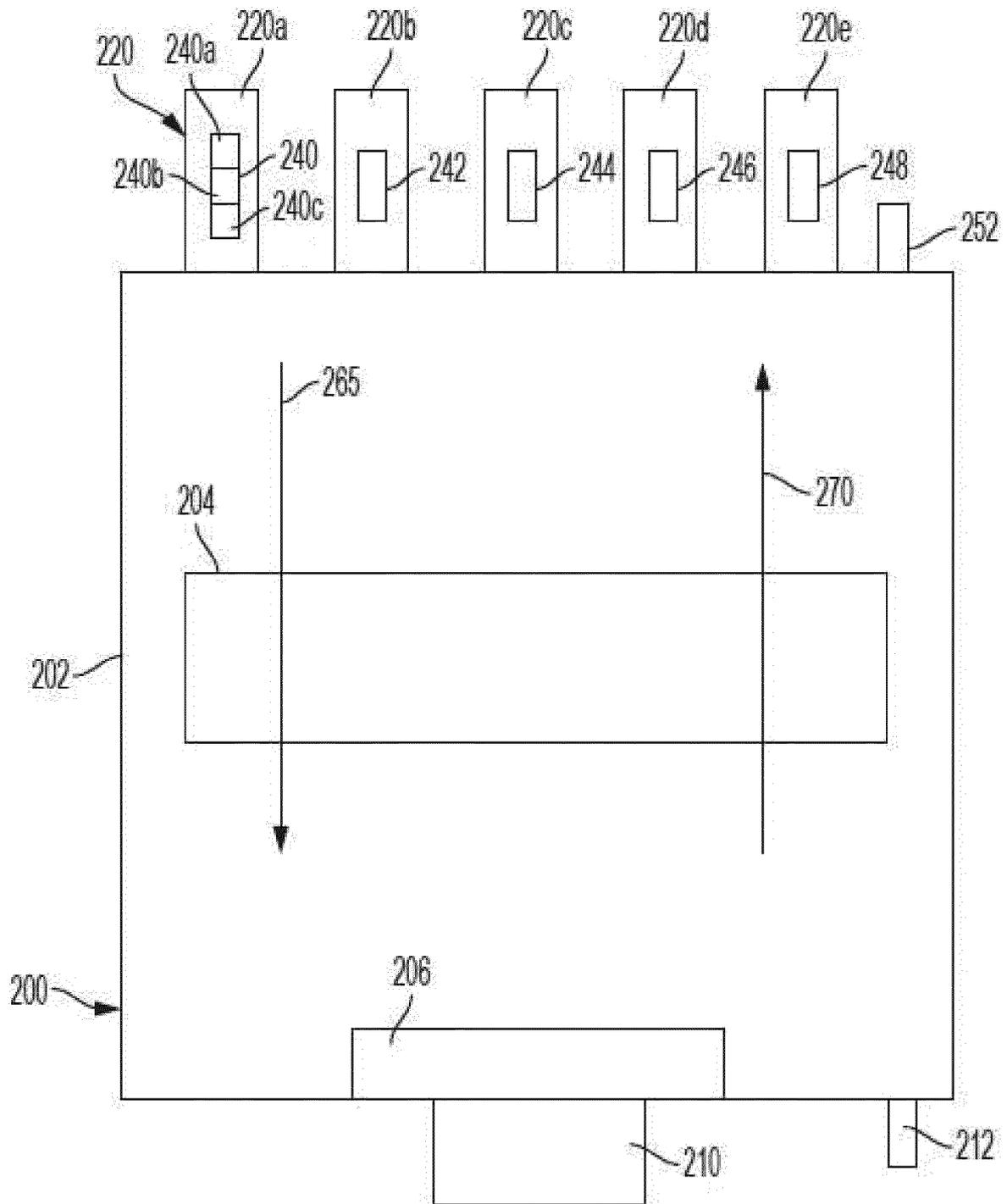
30. Способ по п. 19, отличающийся тем, что набухание смолы происходит главным образом во время псевдооживления, что уменьшает падение давления при последующем протекании жидкости вниз через слой и выходе из нижней части реактора.

31. Способ по п. 19, отличающийся тем, что в некоторых циклах отсутствует кэпирование.

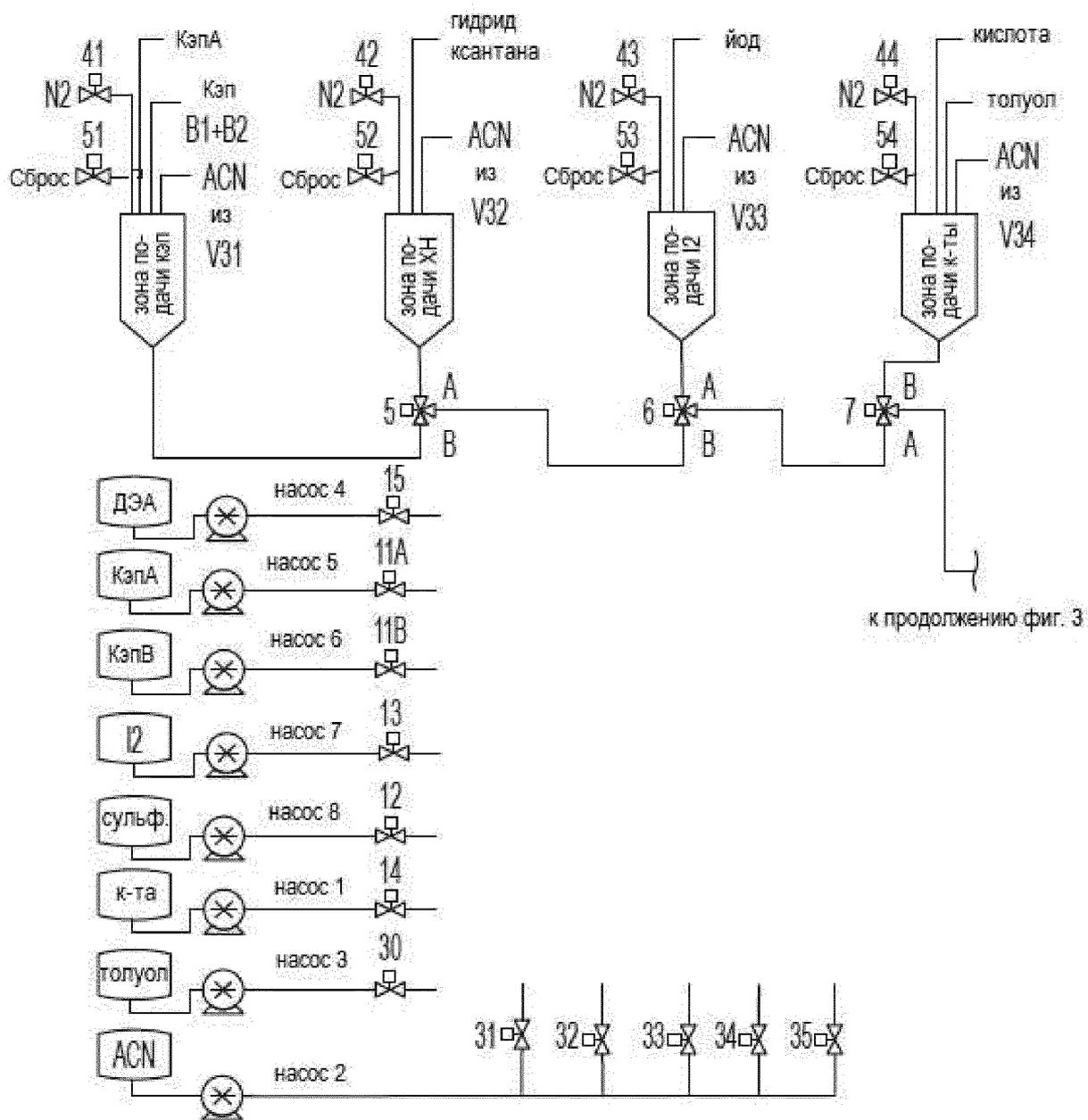
32. Способ по п. 19, отличающийся тем, что для некоторых реакций не выполняют псевдоожигение ни на одной из стадий реакции, а приведение в контакт выполняют только в режиме поршневого потока, например, для деблокирования без псевдоожигения, когда загружают чистый раствор ДСА.
- 5
33. Способ по п. 19, отличающийся тем, что инертный газ проталкивает жидкость вниз через слой смолы, а насос или другое дозирующее устройство на выходе из реактора регулирует скорость потока жидкости через слой.
- 10
34. Способ по п. 19, отличающийся тем, что растворы амидита и активатора загружают в отдельную зону, необязательно смешивают с барботируемым инертным газом в указанной зоне, а затем прокачивают в реактор.
- 15
35. Способ по п. 19, отличающийся тем, что растворы амидита и активатора загружают в отдельную зону, необязательно смешивают с барботируемым инертным газом в указанной зоне, а затем перед подачей в реактор прокачивают в зону подачи.
- 20
36. Способ по п. 19, отличающийся тем, что реагенты загружают в отдельные зоны подачи перед подачей в реактор.
- 25
37. Способ по п. 19, отличающийся тем, что реагенты загружают в общую зону подачи перед подачей в реактор.
38. Способ по п. 19, отличающийся тем, что реагенты подают непосредственно в реактор, а не в зону подачи.
39. Способ по п. 19, отличающийся тем, что промывочный растворитель после реакции сочетания повторно используют в промывочном растворителе после окисления/тиолирования.



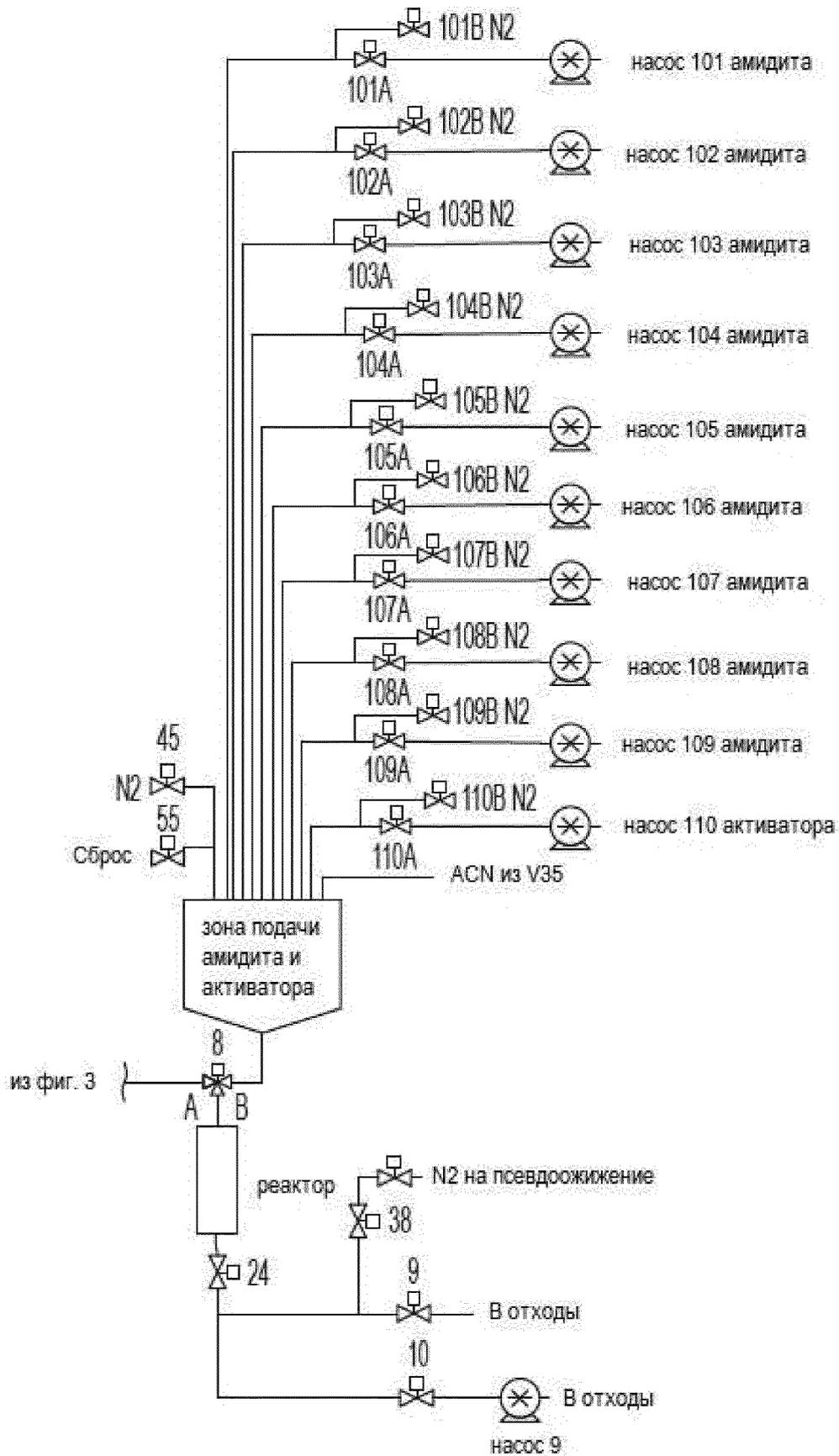
Фиг. 1



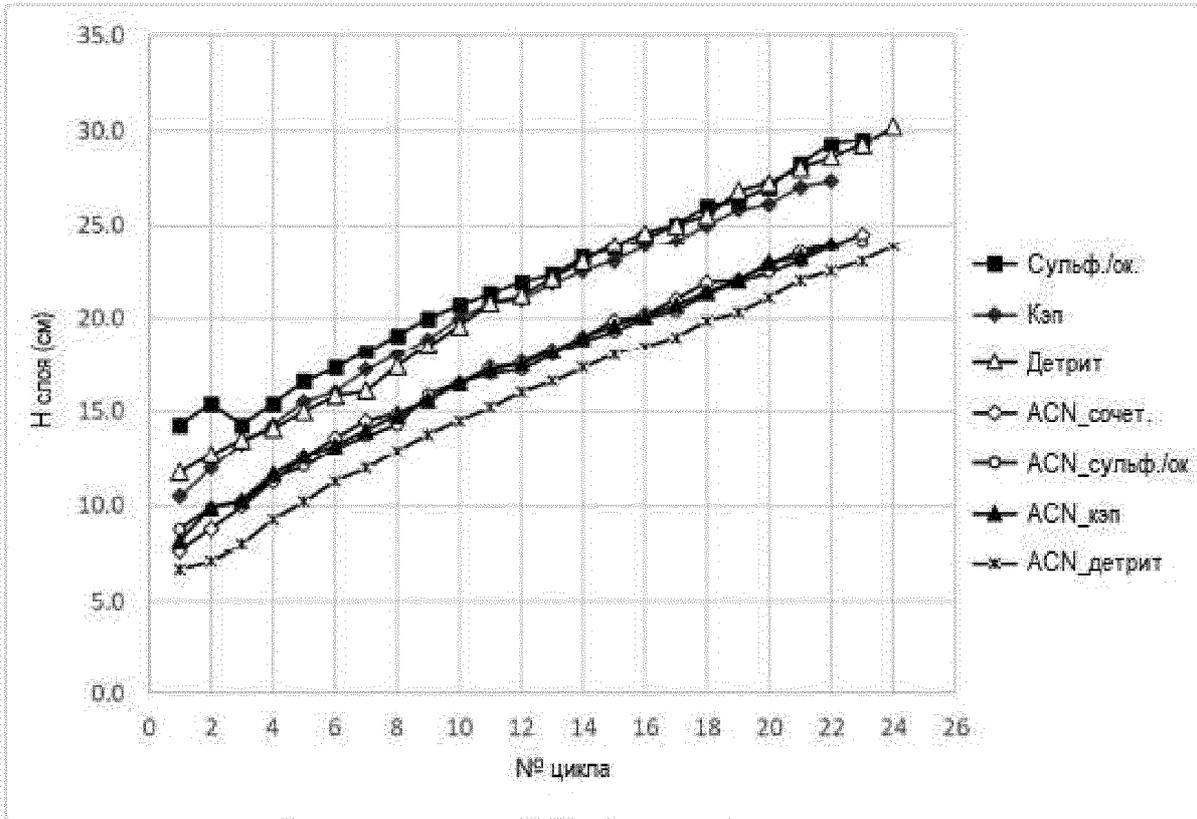
Фиг. 2



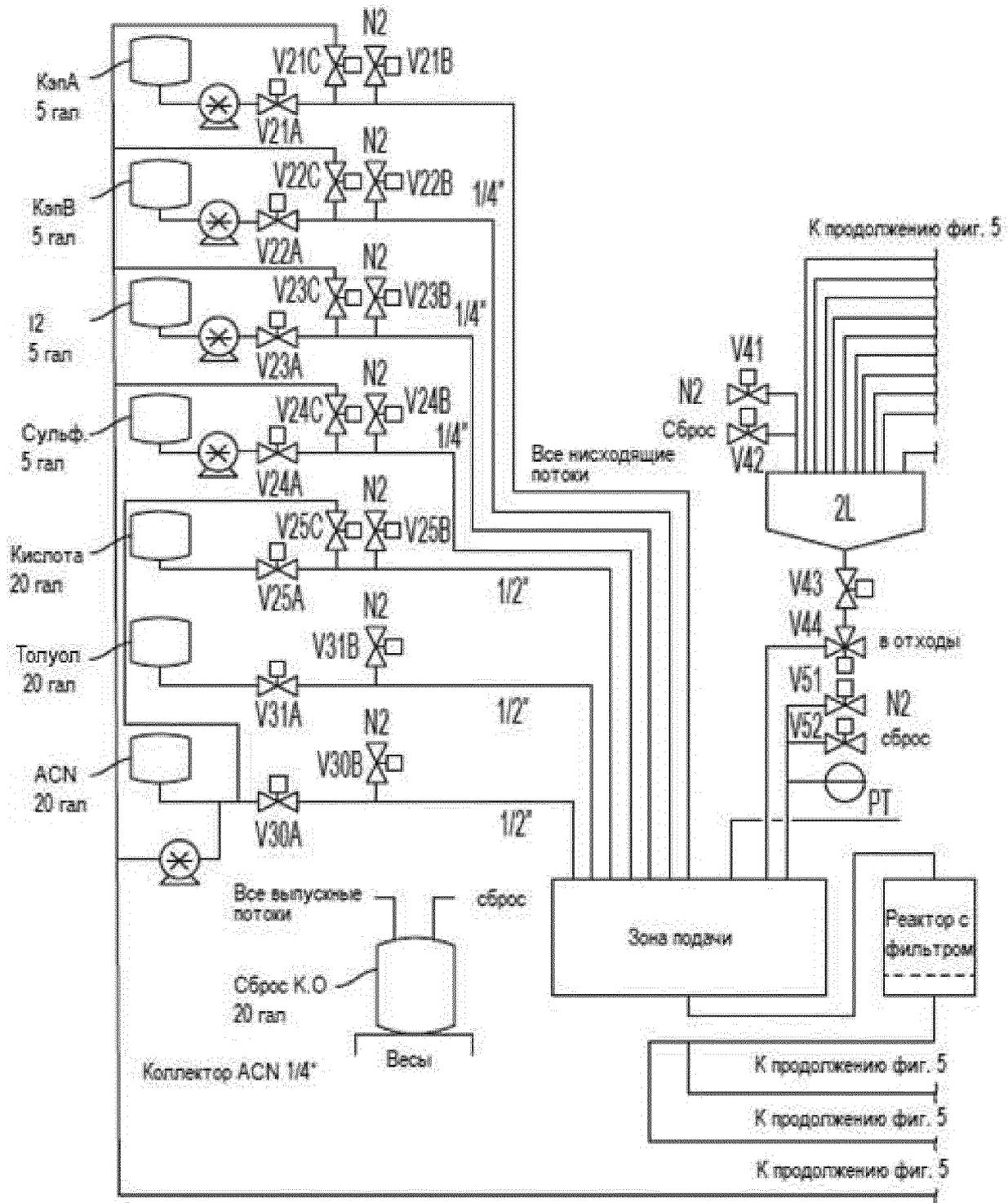
Фиг. 3



Фиг. 3, продолжение

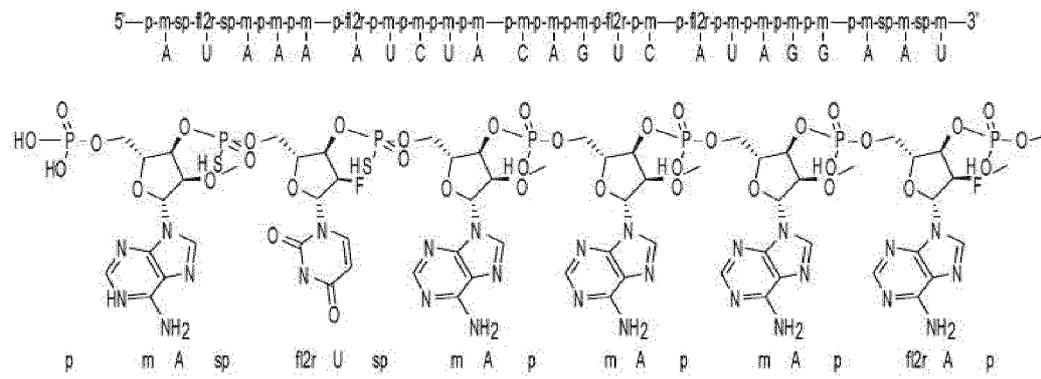


Фиг. 4

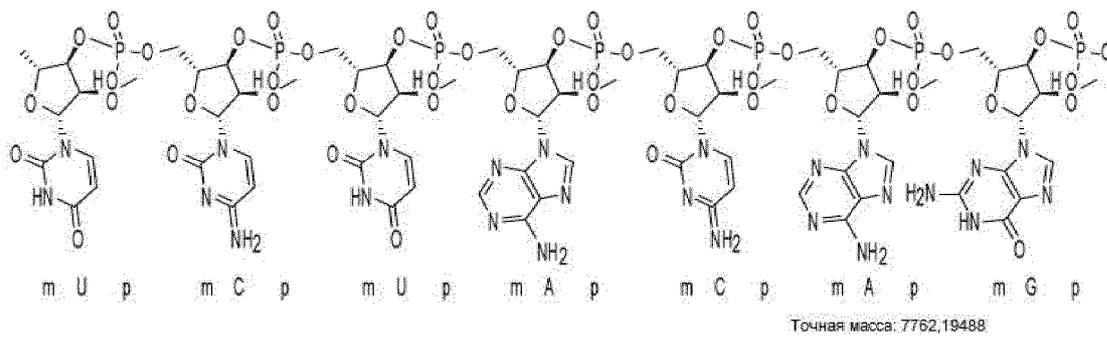


Фиг. 5

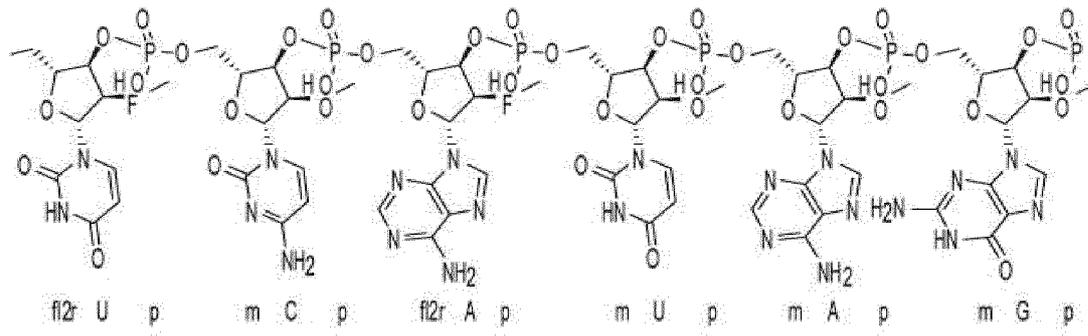




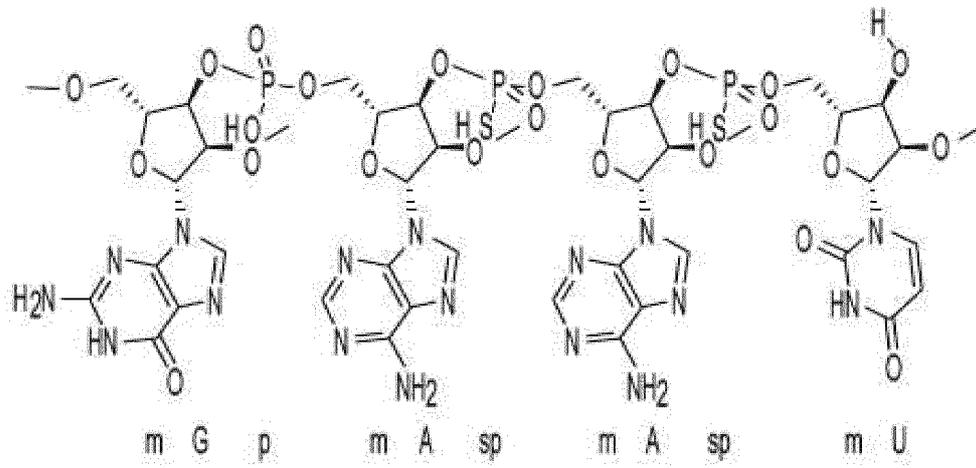
Фиг. 6



Фиг. 6, продолжение



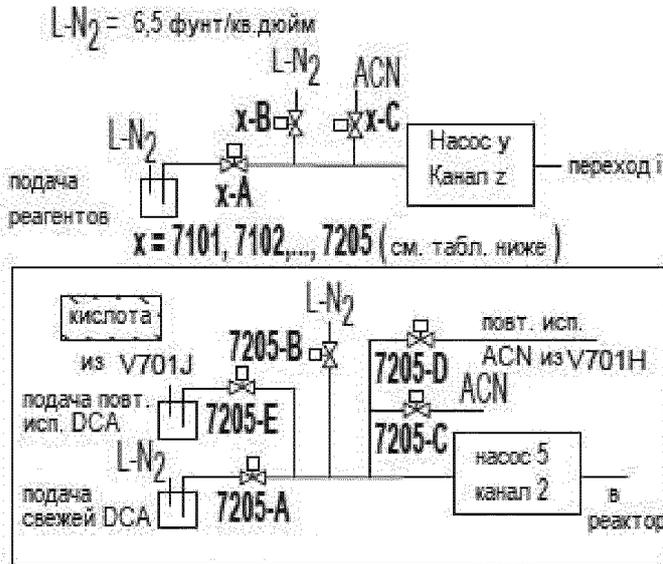
Фиг. 6, продолжение



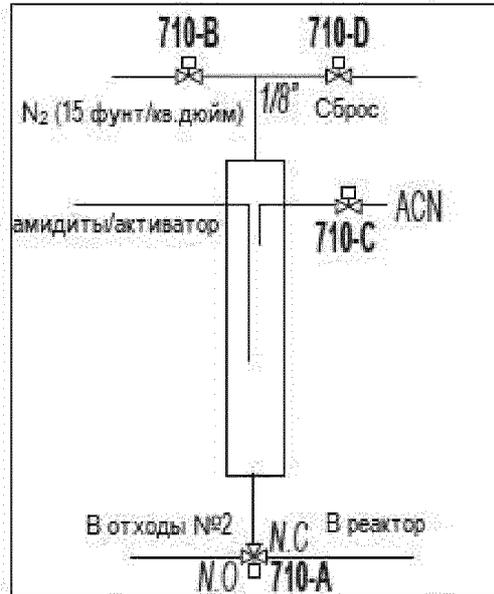
Фиг. 6, продолжение

Схема 314 с повторным использованием кислоты

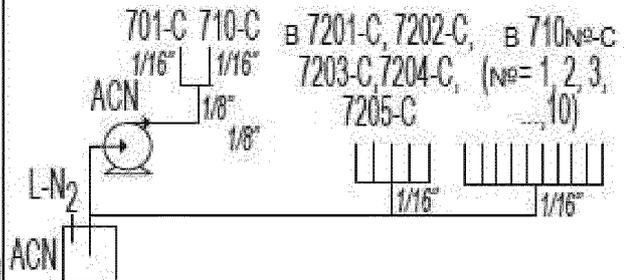
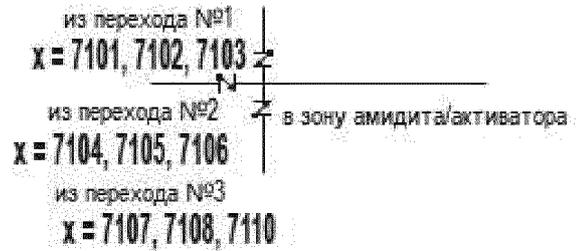
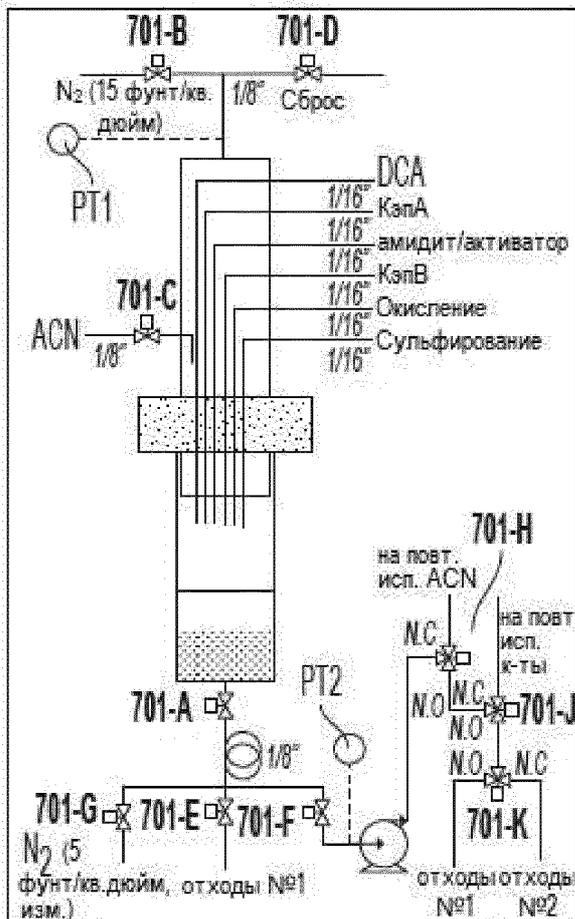
Доставка реагентов



Зона смешивания амидита/активатора



Реактор



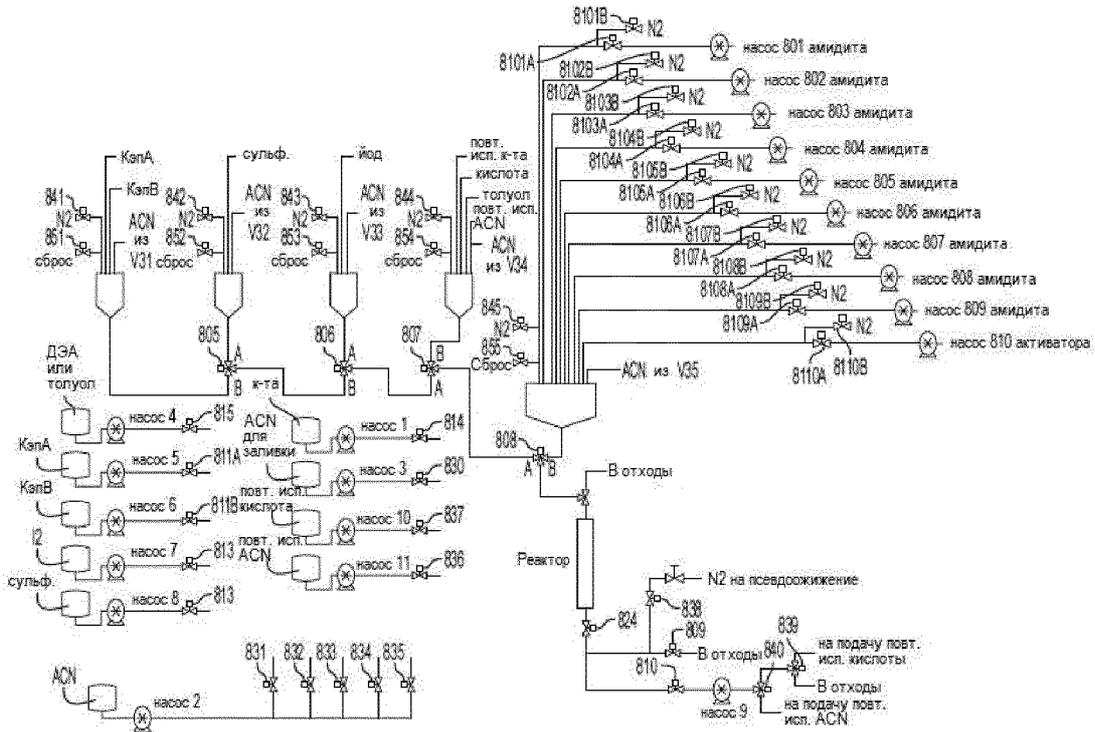
Фиг. 7

Сырье	x (№ линии подачи)	y (№ насоса)	z (№ канала)	Размер трубки, наруж. диам.
AM1	7101	P1	1	1/16"
AM2	7102	P1	2	1/16"
AM3	7103	P1	3	1/16"
AM4	7104	P2	1	1/16"
AM5	7105	P2	2	1/16"
AM6	7106	P2	3	1/16"
AM7	7107	P3	1	1/16"
AM8	7108	P3	2	1/16"
ACT	7110	P3	3	1/16"
КэлА	7201	P4	1	1/16"
КэлВ	7202	P4	2	1/16"
Окисл.	7203	P4	3	1/16"
Сульф.	7204	P5	1	1/16"
DCA	7205	P5	2	1/16"
ACN		P6	1	1/16"
Отходы		P7	1	1/16"

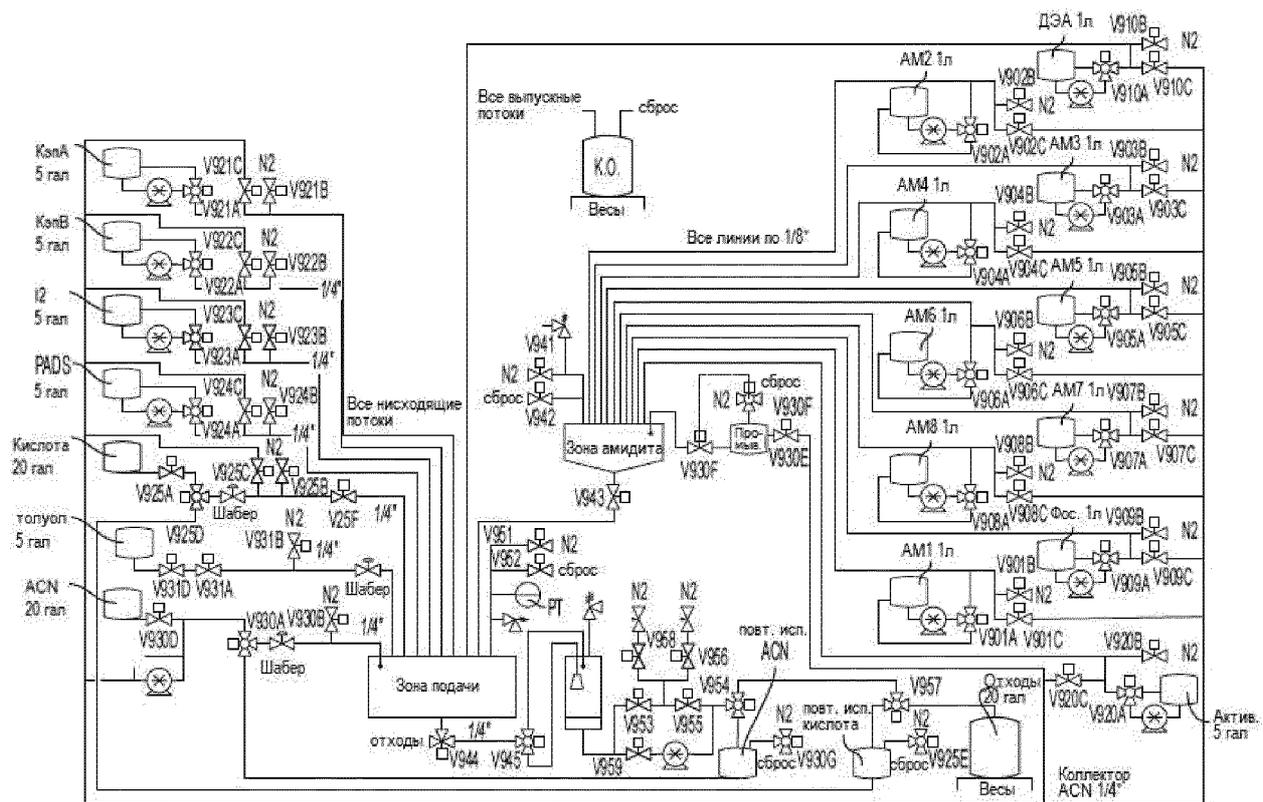
  

x (№ линии подачи)	z (№ перехода)	Размер трубки, наруж. диам.
7101	1	1/16"
7102	1	1/16"
7103	1	1/16"
7104	2	1/16"
7105	2	1/16"
7106	2	1/16"
7107	3	1/16"
7108	3	1/16"
7110	3	1/16"

Фиг. 7, продолжение

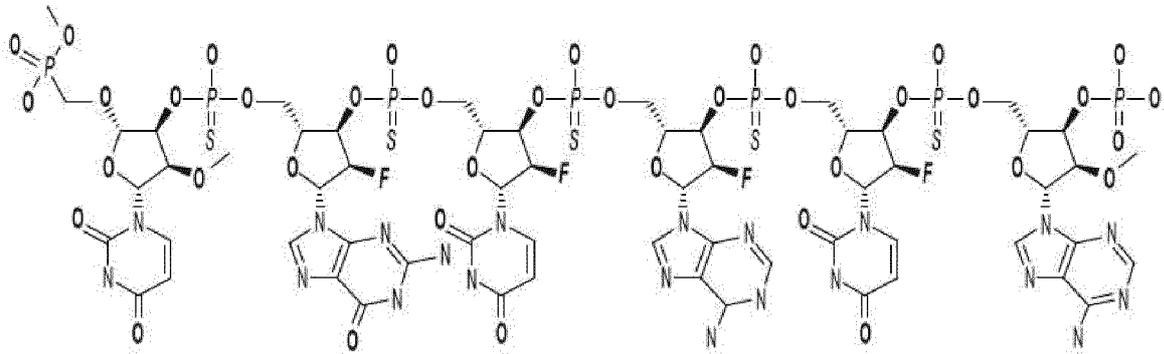


Фиг 8

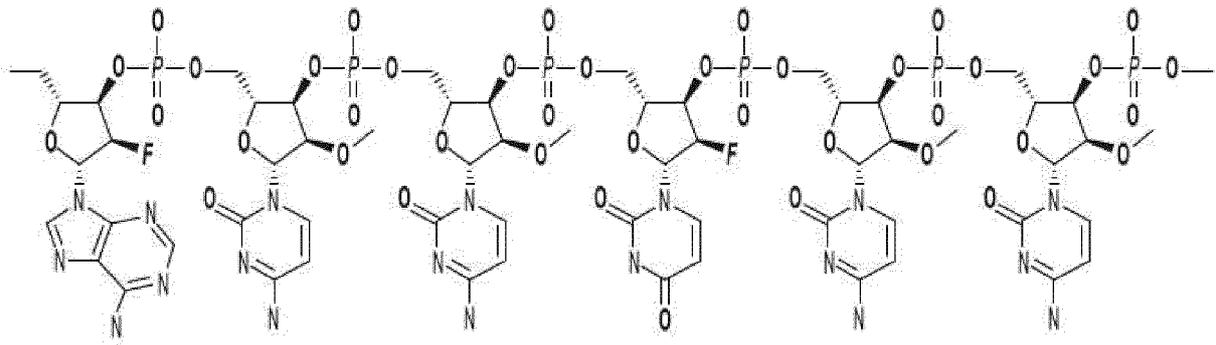


Фиг. 9

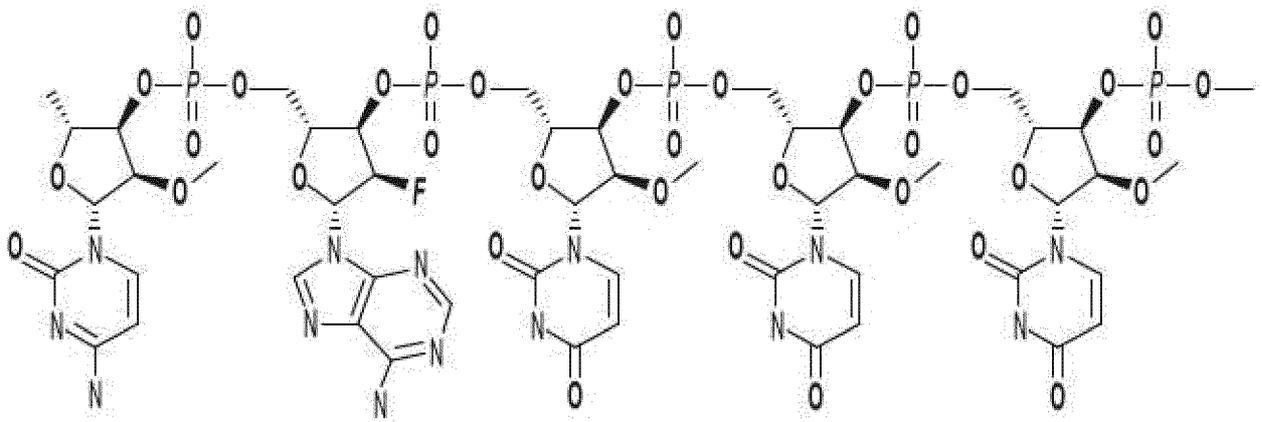
5' MeMOP\*1G\*FU\*1A1UmA fAmCmCfUmUmCmCfAmUmUmUmUmGmA\*mG\*mG3'



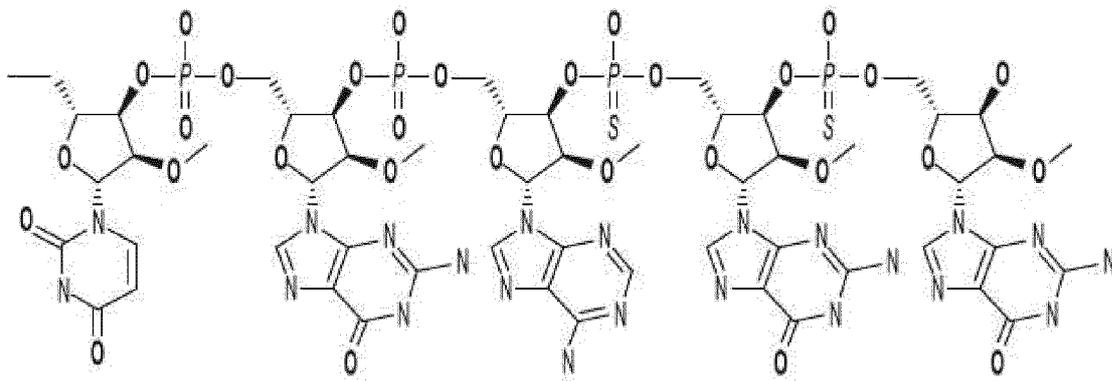
Фиг. 10



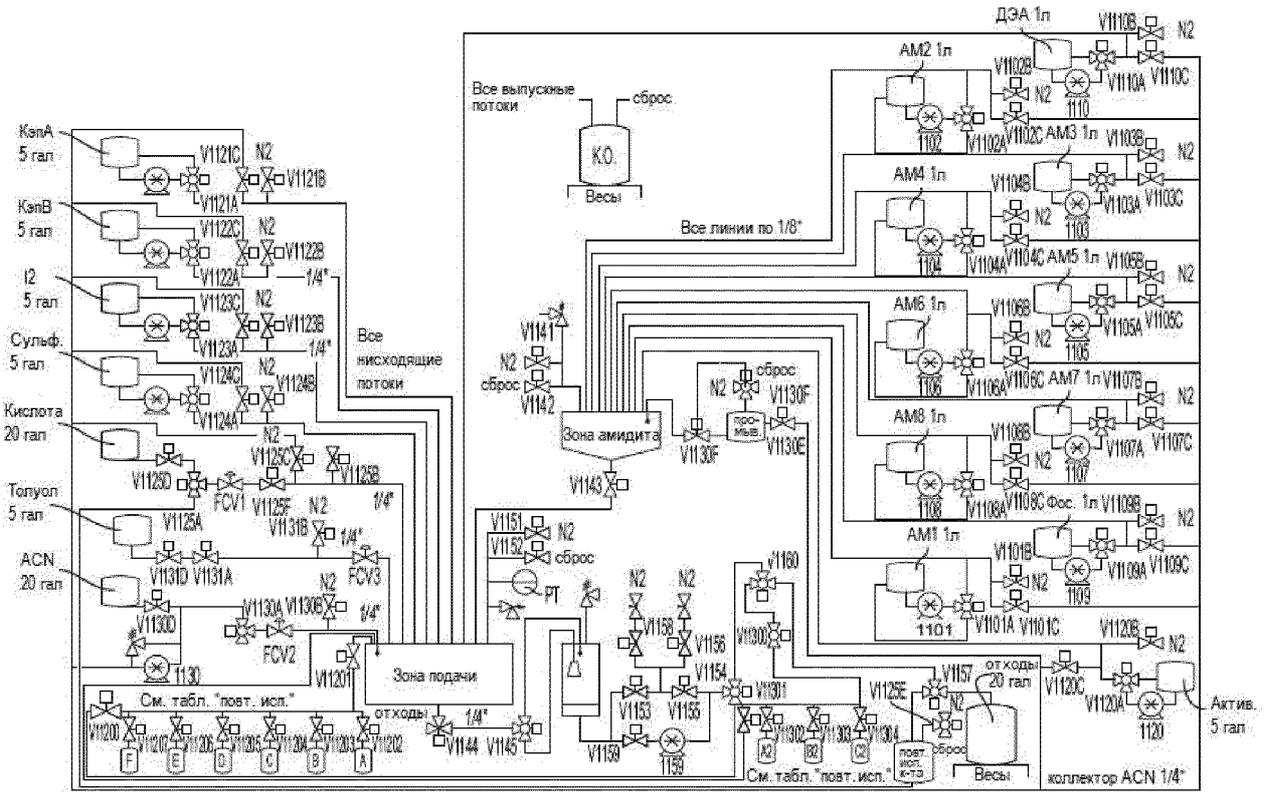
Фиг. 10, продолжение



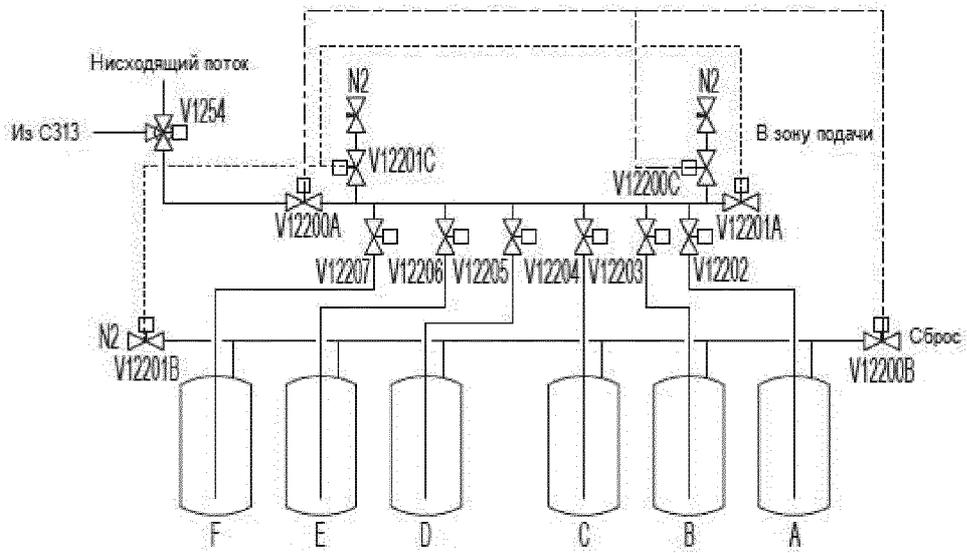
Фиг. 10, продолжение



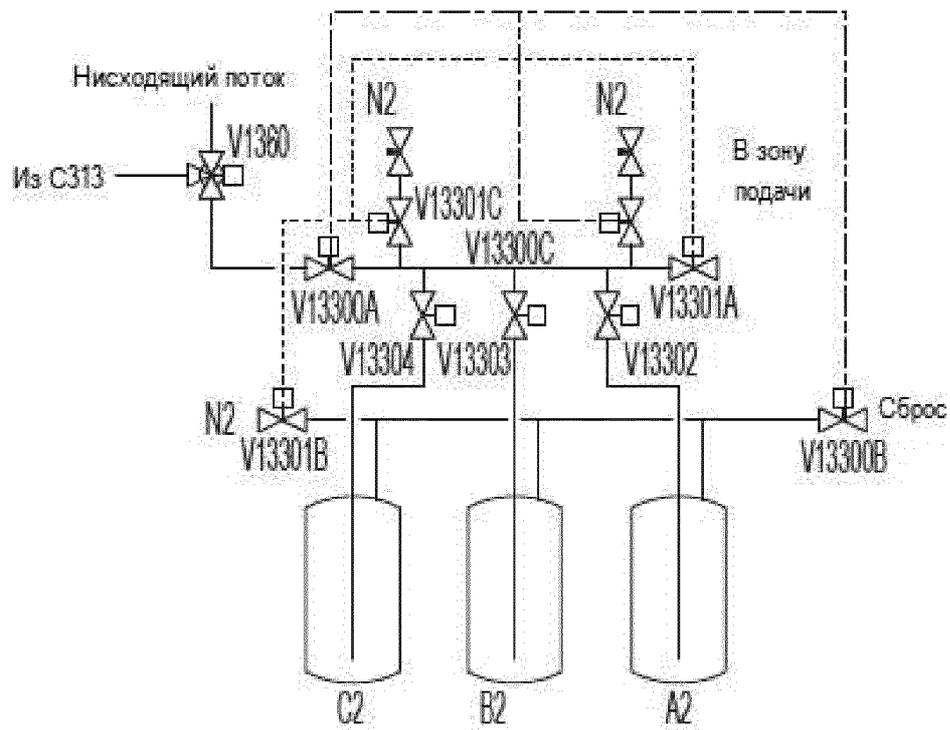
Фиг. 10, продолжение



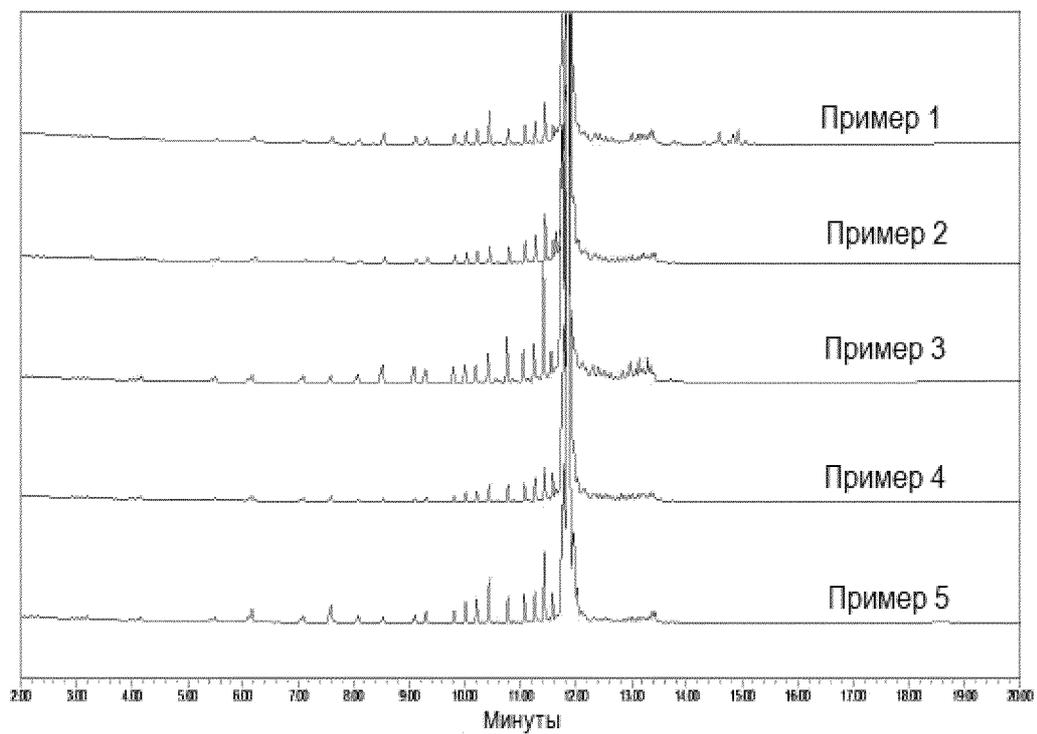
Фиг. 11



Фиг. 12

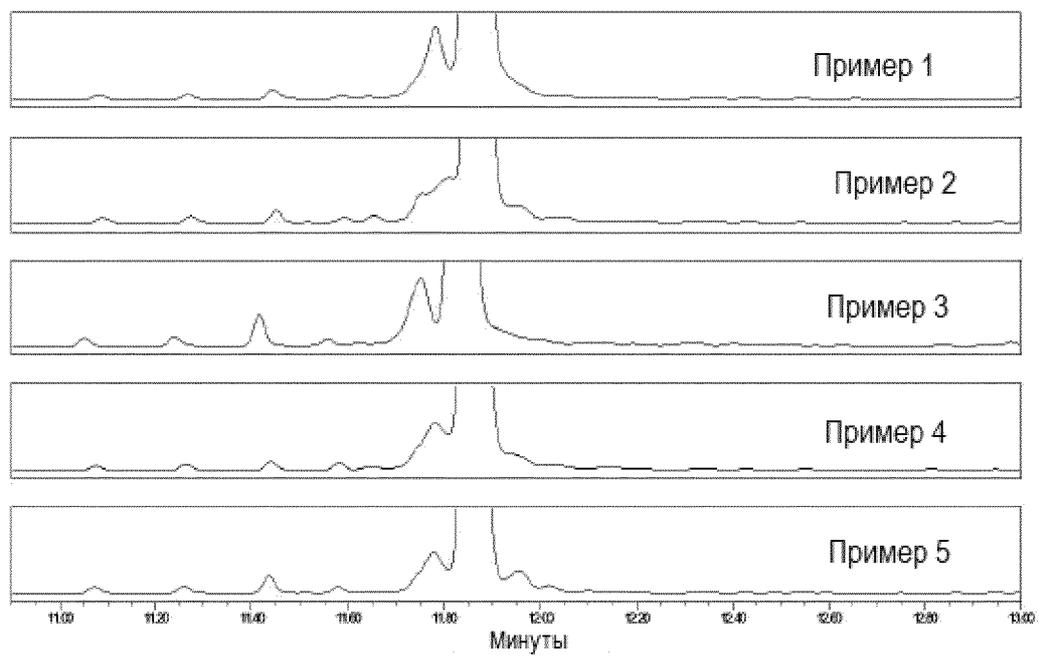


Фиг. 13



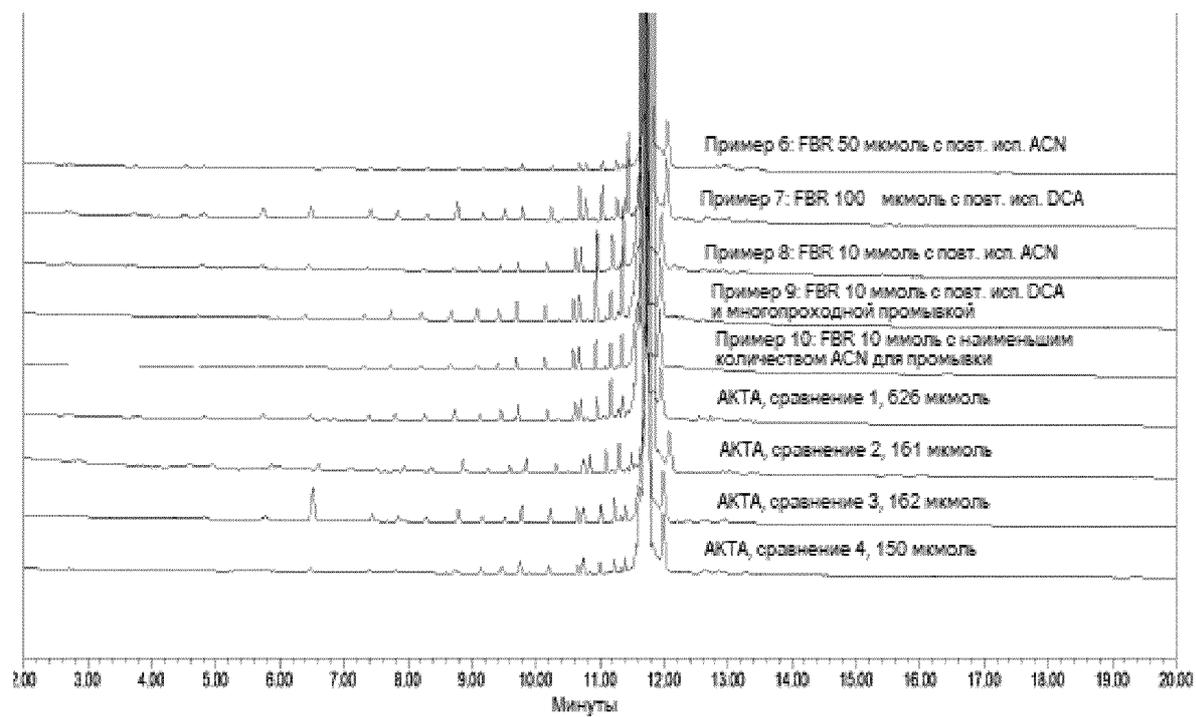
Фиг. 14

Фиг. 14. Наложение хроматограмм СВЭЖХ для примеров 1-5, представленных в таблице 13.



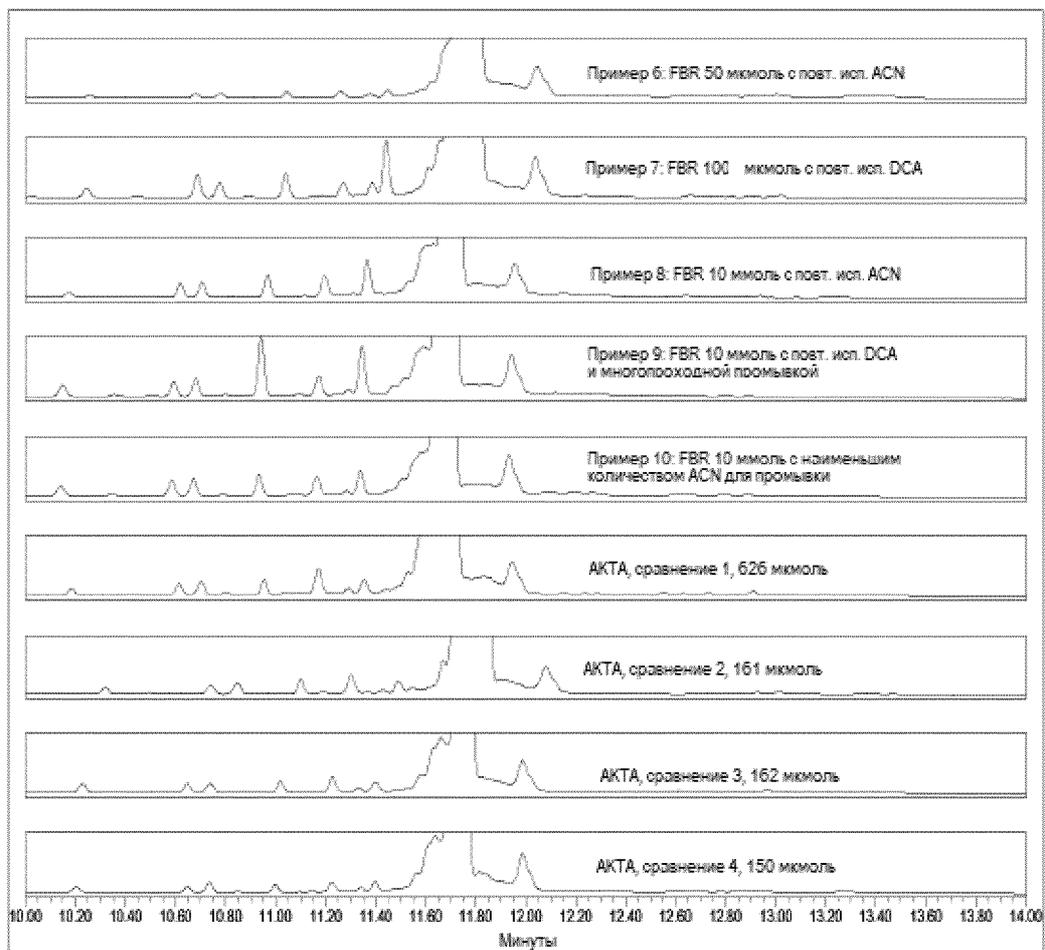
Фиг. 15

Фиг. 15. Наложение хроматограмм СВЭЖХ для примеров 1-5, представленных в таблице 13, при увеличении в области главного пика



Фиг. 16.

Фиг. 16. Наложение хроматограмм СВЭЖХ для примеров 6-10 и «сравнительных примеров АКТА» 1-4, представленных в таблице 17.



Фиг. 17.

Фиг. 17. Наложение хроматограмм СВЭЖХ для примеров 6-10 и «сравнительных примеров АКТА» 1-4, представленных в таблице 17, при увеличении в области главного пика