

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048130**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.28**

(51) Int. Cl. **C07K 1/04** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202292052**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.01.29**

---

(54) **ТРИ РЕАКТОРА СМОЛЫ В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЙ УСТАНОВКЕ ДЛЯ СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ**

---

(31) **62/970,247**

(56) EP-A2-0260634

(32) **2020.02.05**

US-A1-2002019013

(33) **US**

US-A-4362699

(43) **2022.11.22**

EP-A1-2204225

(86) **PCT/US2021/015856**

WO-A2-2012056300

(87) **WO 2021/158444 2021.08.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Джонсон Мартин Д., Копач Майкл Е.,  
Вебстер Люк П. (US)**

(74) Представитель:  
**Гизатуллина Е.М., Христофоров А.А.,  
Угрюмов В.М., Прищепный С.В.,  
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Джермакян Р.В.  
(RU)**

---

(57) В изобретении описано устройство для твердофазного синтеза пептидов (ТФСП) и способ его использования для производства пептидов. Система включает по меньшей мере два реактора, каждый из которых включает некоторое количество смолы для ТФСП. Реакторы расположены последовательно. Средство для снятия защиты добавляют в первый реактор, а затем последовательно подают во второй и третий реакторы, тем самым снимая защиту с защищенной N-группы. Промывочный раствор добавляют в первый реактор, а затем переносят во второй, и данную операцию повторяют несколько раз. Подобным образом, раствор сложного эфира, активированного аминокислотой, последовательно добавляют в первый, второй и третий реакторы, в результате чего происходит связывание аминокислоты с незащищенной N-группой. Промывочный раствор добавляют в первый реактор, а затем переносят во второй, и данную операцию повторяют несколько раз перед следующим циклом. Использование последовательно расположенных реакторов снижает общее требуемое количество растворителя. Также для контроля за ходом и идентификацией реакций, происходящих внутри частиц твердофазной смолы, используется онлайн-ЖХ-МС.

---

**B1**

**048130**

**048130**

**B1**

### Область техники

Настоящее раскрытие относится к новой системе и способу синтетического производства пептидов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к устройству, в котором последовательно используют полимерные реакторы в качестве механизма для связывания пептидов вместе в рамках твердофазного синтеза пептидов.

### Уровень техники

Твердофазный синтез пептидов ("ТФСП") представляет собой способ и систему, наиболее часто используемые для синтеза полипептидов и аминокислотных последовательностей. ТФСП включает связывание активированной аминокислоты (которая обычно является концевой или последней аминокислотой в последовательности) с твердой подложкой. Данная твердая подложка обычно представляет собой гранулы полимерной смолы, которые функционализованы (например, группой  $\text{NH}_2$ ). Концевая аминокислота (которая обычно имеет  $\text{NH}_2$ -конец, защищенный посредством F-мос, ВОС или другой защитной группы) взаимодействует со смолой таким образом, что функционализованная группа на смоле взаимодействует с активированной группой  $\text{COOH}$  концевой аминокислоты и связывается с ней. Таким образом, концевая аминокислота ковалентно присоединена к смоле.

Затем, на следующей стадии, с  $\text{NH}_2$ -конца концевой аминокислоты снимают защиту, тем самым открывая ее  $\text{NH}_2$ -группу для следующей реакции. Соответственно, вводится новая аминокислота. Данная новая аминокислота имеет свой  $\text{NH}_2$ -конец, защищенный защитной группой (такой как Fмос, ВОС или другая защитная группа). Таким образом, при добавлении данной новой аминокислоты активированный сложный эфир новой аминокислоты взаимодействует с  $\text{NH}_2$ -группой с вновь снятой защитой концевой аминокислоты, тем самым связывая данные две аминокислоты вместе. Как только данная новая аминокислота была присоединена, она также имеет защищенную группу  $\text{NH}_2$ , с которой впоследствии может быть снята защита и которая может реагировать со следующей аминокислотой. Посредством выполнения данного повторяющегося итеративного процесса снова и снова можно построить всю аминокислотную последовательность. Как только вся последовательность сконструирована, последовательность может быть отделена (отщеплена) от смолы и удалена защита, с получением таким образом аминокислотной структуры (следует отметить, что боковые цепи различных аминокислот ( $R_1$ ,  $R_2$  и т. д.), которые добавляются посредством данного процесса, могут быть ортогонально защищены такими группами, как ВОС, трет-бутил или тритил и т.д., для предотвращения появления таких боковых цепей вследствие взаимодействия в процессе синтеза аминокислот. Кроме того, одна или более аминокислот могут иметь "боковую цепь" или другую группу как часть своей структуры, которая, возможно, также должна быть защищена. Тем не менее, специалистам в данной области будет понятно, как такие боковые цепи или другие группы могут быть сконструированы, защищены и впоследствии удалены в процессе синтеза).

Несмотря на то, что данный процесс ТФСП используют в коммерческих целях и до сих пор является стандартом в синтезе пептидов, у него есть недостаток, заключающийся в том, что он является дорогостоящим и требует много времени. С каждой добавляемой аминокислоты должна быть снята защита и она должна быть связана, что сложно и обычно приводит к использованию большого количества растворителей. Усугубляет ситуацию то, что многие из данных растворителей не являются экологически чистыми.

Соответственно, усовершенствование заключалось бы в обнаружении нового способа использования ТФСП, который устранял бы один или более из данных недостатков, особенно при коммерческом производстве пептидов. Еще большим достижением была бы большая экологичность такой системы и снижение производственных затрат. Фактически, в настоящих вариантах осуществления специально обеспечено уменьшение количества отходов и количества используемых растворителей и реагентов. Такой способ и система раскрыты в данном документе.

### Сущность изобретения

Способ и система для связывания "X" активированного эфира аминокислоты с защищенной N-группой (например,  $\text{NH}_2$ -конец) аминокислоты, которая присоединена к смоле ТФСП. Как правило, система будет включать набор реакторов, расположенных последовательно. В некоторых вариантах осуществления два или более реакторов расположены последовательно. В предпочтительном варианте 3 или более реакторов расположены последовательно.

Каждый реактор содержит некоторое количество защищенной N-группы, присоединенной к смоле для пептидного синтеза. Данная защищенная N-группа может представлять собой группу  $\text{NH}_2$  аминокислоты или может представлять собой группу  $\text{NH}_2$ , находящуюся на самой смоле или ковалентно присоединенную к ней, такую как без ограничения амидные смолы Зиберы или амидные смолы Ринка. Также могут быть использованы другие типы смол, такие как смолы Ванга или смолы СТС (хлортритилхлорид).

Первая стадия процесса включает добавление первого количества реагента для снятия защиты в первый реактор и обеспечение контакта данного реагента с защищенной N-группой. Затем данное первое количество реагента для снятия защиты переносят из первого реактора во второй реактор, а второе количество реагента для снятия защиты - в первый реактор. Первое количество реагента для снятия защиты удаляют из второго реактора, а второе количество реагента для снятия защиты переносят из первого ре-

актора во второй реактор. Затем данное второе количество реагента для снятия защиты удаляют из второго реактора.

Цель приведения в контакт первого и второго реакторов с первым и вторым количеством реагента для снятия защиты заключается в том, чтобы данный реагент для снятия защиты прореагировал с защищенной N-группой и действовал бы, отдельно или вместе, для снятия защиты с защищенной N-группы, присоединенной к смоле для пептидного синтеза как в первом, так и во втором реакторах. Таким образом, при добавлении первого и второго количества реагента со снятой защитой N-группа как в первом, так и во втором реакторе становится незащищенной и может быть присоединена к другой аминокислоте. Первое количество промывной воды добавляют в первый реактор, затем переносят во второй реактор, а затем в отходы. Цикл промывки повторяют несколько раз. Промывку растворителем можно применять с "зелеными" растворителями или растворителями, более безвредными для окружающей среды, которые обычно используют с ТФСП. Такие "зеленые" растворители для промывки включают ацетонитрил (ACN), этилацетат, изопропилацетат, 2-MeTHF (2-метилтетрагидрофуран) и CPME (циклопентилметилэфир) или смеси растворителей, такие как NBP/THF 2/1 об./об., которые проиллюстрированы в данном документе. Химические реакции также могут происходить в ACN, ACN/DMSO или н-бутилпирролидиноне, которые также являются "зелеными" растворителями.

Соответственно, первое количество аминокислоты "X" и первое количество растворителя добавляют в первый реактор, а затем через определенное время переносят из первого реактора во второй реактор. Следует отметить, что количества аминокислоты "X", добавляемые в реакторы, фактически представляют собой "активированные сложные эфиры" аминокислоты X, которые облегчают таким образом реакцию сочетания. Тем не менее, для краткости в данном документе это может называться просто добавлением "количества аминокислоты X" в реактор, но специалистам в данной области будет понятно, что это активированный сложный эфир. В качестве альтернативы, в реактор можно добавить неактивированную аминокислоту, а затем добавить активирующий раствор для реакции и превращения аминокислоты в активированный сложный эфир. Это также подпадает под определение добавления к смоле эфира, активированного аминокислотой в контексте данного документа.

В первый реактор добавляют второе количество аминокислоты "X" и второе количество растворителя. Первое и второе количества активированного сложного эфира аминокислоты "X" либо по отдельности, либо вместе связывают аминокислоту "X" с незащищенной N-группой в первом реакторе. (Активированный сложный эфир аминокислоты "X" может представлять собой любую аминокислоту, включая функционализированные, дериватизированные или синтетические аминокислоты, которые необходимо добавить в цепь). (В контексте настоящего описания иногда упоминается, что аминокислота "X" связана, однако специалистам в данной области будет понятно, что именно активированный сложный эфир чаще всего используют для облегчения реакции).

Первое количество аминокислоты "X" и первое количество растворителя удаляют из второго реактора, а второе количество аминокислоты "X" и второе количество растворителя переносят из первого реактора во второй реактор. Затем из второго реактора удаляют второе количество аминокислоты "X" и второе количество растворителя. Первое и второе количества аминокислоты "X", либо по отдельности, либо вместе, связывают аминокислоту "X" с незащищенной N-группой во втором реакторе. Первое количество растворителя для промывки добавляют в первый реактор, затем переносят во второй реактор, а затем в отходы. Цикл промывки растворителем повторяют несколько раз. Второе количество растворителя для промывки может находиться в первом реакторе одновременно с первым количеством промывочного растворителя во втором реакторе, и так далее. Таким образом, после выполнения данных шагов аминокислота "X" будет присоединена к незащищенной N-группе, тем самым добавляя аминокислоту "X" к цепи. Конечно, как и в других системах ТФСП, аминокислота "X" содержит защищенную группу NH<sub>2</sub>, и, таким образом, вышеописанный процесс можно повторить (например, снятие защиты с группы NH<sub>2</sub> и присоединение к ней новой аминокислоты, посредством описанного выше способа). Таким образом, повторяя данный процесс, можно сконструировать необходимую аминокислотную последовательность и/или пептид. После завершения синтеза сконструированная аминокислота может быть высвобождена (отцеплена) из смолы как в первом реакторе, так и во втором реакторе.

Несмотря на то, что в указанном выше способе используют два последовательно соединенных реактора, каждый с подачей смолы, могут быть разработаны другие варианты осуществления, в которых третий реактор, также содержащий некоторое количество смолы, включают последовательно с первыми двумя реакторами. В данном варианте осуществления стадия снятия защиты также должна происходить в третьем реакторе. Таким образом, после удаления первого количества реагента для снятия защиты из второго реактора его добавляют в третий реактор. Данное первое количество реагента со снятой защитой удаляют из третьего реактора, а затем в третий реактор добавляют второе количество средства со снятой защитой после его удаления из второго реактора. Подобным образом третье количество реагента для снятия защиты будут добавлять в первый реактор, перемещать во второй реактор, а затем перемещать в третий реактор. Назначение первого, второго и третьего количества реагента для снятия защиты, по отдельности или вместе, состоит в снятии защиты с защищенной N-группы, присоединенной к смоле для синтеза пептидов в третьем реакторе. Подобным образом первое количество аминокислоты "X" и первое

количество растворителя для третьего реактора будут добавлены в третий реактор после их удаления из второго реактора. Подобным образом второе количество аминокислоты "X" и второе количество растворителя для третьего реактора будут добавлять в третий реактор после его удаления из второго реактора. Третье количество аминокислоты "X" и третье количество растворителя последовательно циркулируют через первый, второй и третий реакторы. Первое, второе и третье количества аминокислоты "X" по отдельности или вместе связывают аминокислоту "X" с незащищенной группой N в третьем реакторе. Затем выполняют стадию промывки, как описано выше. Таким образом, аминокислотная последовательность может быть построена во всех трех реакторах итеративно (посредством повторения данных или подобных стадий для каждой аминокислоты), а затем высвобождена из смол в каждом из трех реакторов.

Таким образом, в настоящих вариантах осуществления представлены различные реакторы, расположенные последовательно, и что реагенты будут добавляться в первый реактор, а затем впоследствии и последовательно перемещаться во второй реактор, затем в третий реактор и т. д. При последовательном расположении таких реакторов каждый реактор может содержать количество смолы, которое будет применяться в ТФСЦ, который будет использоваться для построения пептидной последовательности. Тем не менее, при таком расположении реакторов потребуется меньшее количество растворителя (промывочного материала). Подобным образом может потребоваться меньшее количество связывающего реагента, что приведет к меньшему количеству отходов и более эффективному и экологически безопасному процессу.

#### **Краткое описание графических материалов**

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

Фиг. 1 представляет собой схематический вид системы и способа связывания аминокислоты "X" с защищенной N-группой, присоединенной к смоле для пептидного синтеза, используемой в настоящем документе;

фиг. 2 представляет собой схематический вид системы и способа связывания аминокислоты "X" с защищенной N-группой, присоединенной к смоле для пептидного синтеза, используемой в настоящем документе;

фиг. 3 представляет собой схематический вид системы и способа связывания аминокислоты "X" с защищенной N-группой, присоединенной к смоле для пептидного синтеза, используемой в настоящем документе;

фиг. 4 представляет собой схематический вид системы и способа онлайн-ЖХМС, используемых с системой, показанной на фиг. 3;

фиг. 5 представляет собой вид в перспективе трех последовательно соединенных реакторов, используемых в настоящих вариантах осуществления;

на фиг. 6 показан пептид, который может быть получен с использованием вариантов осуществления настоящего изобретения; а также

на фиг. 7 показан пептид, который можно получить с использованием вариантов осуществления по настоящему изобретению.

#### **Подробное описание изобретения**

В целях содействия пониманию принципов данного изобретения будут сделаны ссылки на варианты осуществления настоящего изобретения, проиллюстрированные на графических материалах, а для их описания будут применяться конкретные формулировки. Тем не менее, следует понимать, что таким образом не предусмотрено ограничение объема настоящего изобретения.

Обратимся теперь к фиг. 1, схематическому виду системы 100 для связывания аминокислоты "X" с защищенной N-группой, которая присоединена к смоле для синтеза пептидов. В системе 100 реализован описанный в данном документе процесс, и она представляет собой модифицированную систему ТФСЦ, предназначенную для получения пептидов и/или аминокислотных последовательностей. Система 100 включает по меньшей мере два реактора, которые обозначены как первый реактор 106 и второй реактор 108. Данные реакторы 106, 108 расположены последовательно. Можно использовать более двух реакторов. Фактически в системе 100, показанной на фиг. 1, третий реактор 112 также расположен последовательно. Можно также использовать более трех реакторов.

Каждый из реакторов содержит количество смолы 116. Смола включает защищенную N-группу 120 (такую как защищенная группа  $\text{NH}_2$ ). В некоторых вариантах осуществления данная защитная группа, используемая для защищенной N-группы, представляет собой группу Fmoc. Специалисты в области ТФСЦ оценят типы смол, которые можно использовать в качестве смолы 116, включая амидную смолу Зиберы и амидную смолу Ринка. В рамках процесса ТФСЦ защищенная N-группа должна быть "незащищена" для обеспечения ее возможности реагировать с аминокислотой (и, таким образом, действовать для построения последовательности пептид/аминокислота). Таким образом, происходит процесс снятия защиты. Данное снятие защиты происходит посредством добавления первого количества реагента для снятия защиты 126. (Данное первое количество реагента 126 для снятия защиты графически представлено стрелкой). В некоторых вариантах осуществления реагент для снятия защиты может представлять собой пиперидин, но также могут использоваться другие материалы/реагенты.

Первое количество реагента 126 для снятия защиты можно перемешать и оставить для взаимодействия с защищенной N-группой 120 на смоле 116 в первом реакторе 106 в течение определенного периода времени. (Специалистам в данной области будет понятно, как определить точные развертки времени, необходимое в настоящем изобретении). Затем первое количество реагента 126 для снятия защиты удаляют из первого реактора 106 и переносят во второй реактор 108 (как показано стрелкой 128). Данное первое количество реагента 126 для снятия защиты можно перемешать и оставить для взаимодействия с защищенной N-группой 120 на смоле 116 во втором реакторе 108 в течение некоторого периода времени. В то же время в первый реактор 106 добавляют второе количество реагента 130 для снятия защиты, и ему дают возможность прореагировать аналогичным образом.

Как только данные реакции завершены (или, другими словами, истекло отведенное время), первое количество реагента для снятия защиты 126 удаляют из второго реактора 108 и переносят в третий реактор 112 (как показано стрелкой 136). Аналогичным образом второе количество реагента 130 для снятия защиты удаляют из первого реактора 106 и переносят во второй реактор 108 (как показано стрелкой 140). Затем в первый реактор 106 добавляют третье количество реагента для снятия защиты 134. В указанное время реакции в первом реакторе 106, втором реакторе 108 и третьем реакторе 112 продолжают.

После завершения данных реакций в первом реакторе 106, втором реакторе 108 и третьем реакторе 112 (или, другими словами, по истечении отведенного времени) первое количество реагента для снятия защиты 126 удаляют из третьего реактора 112. Второе количество реагента 130 для снятия защиты удаляют из второго реактора 108 и переносят в третий реактор 112 (как показано стрелкой 144). Третье количество реагента 134 для снятия защиты можно удалить из первого реактора 106 и добавить во второй реактор 108 (как показано стрелкой 146).

В некоторых вариантах осуществления данное первое количество реагента 126 для снятия защиты, которое было удалено из третьего реактора 112, может быть отправлено в дополнительный реактор (если вариант осуществления включает дополнительный реактор). В других вариантах осуществления данное первое количество реагента 126 для снятия защиты собирают и отправляют в отходы. Это также произойдет со вторым и третьим количествами реагентов для снятия защиты 130, 134 после их прохождения через третий реактор 112. В других вариантах осуществления, включая вариант, показанный на фиг. 1, данное первое количество реагента для снятия защиты 126 (а затем второй и третий реагенты для снятия защиты 130, 134) можно вернуть в первый реактор 106 (как показано стрелкой 148), так что дополнительные итерации снятия защиты можно выполнять по необходимости. (Следует обратить внимание, что если реагенты для снятия защиты возвращают в первый реактор, данный процесс будет больше похож на периодическую реакцию и, вероятно, будет менее эффективным).

Третье количество реагента 134 будет удалено из первого реактора 106 и перенесено во второй реактор 108. Затем данное количество реагента 134 проходит через второй реактор 108 и третий реактор 112, как описано в данном документе, (хотя стрелка для третьего количества реагента 134, направляемого из второго реактора 108 в третий реактор 112, не показана).

Специалистам в данной области будет понятно, что по мере необходимости можно вносить поправки на прокачку первого, второго или третьего количества реагентов для снятия защиты 126, 130, 134 с поддержанием объема реагента в каждом количестве (и в каждом реакторе) однородным или почти однородным.

Как будет очевидно специалистам в данной области, назначение реагентов 126, 130, 134 для снятия защиты, которые добавляют в первый, второй и третий реакторы 106, 108, 112, либо по отдельности, либо вместе, заключается в работе для снятия защиты с защищенной N-группы 120, прикрепленной к смолам для пептидного синтеза 116. Таким образом, последовательно снимая защиту с N-группы с использованием количества реагента, проходящего циклически последовательно, как описано в настоящем документе, N-группа может быть готова к реакции связывания, которая будет действовать для связывания N-группы с другой аминокислотой (как будет более подробно описано ниже).

При необходимости, после снятия защиты N-группа, присоединенная к смоле 116, может быть "промыта" растворителем, таким как DMF. Также можно использовать другие растворители, включая NBP (N-бутилпирролидинон), NMP (N-метил-2-пирролидон), DMSO, ацетаты и простые эфиры, такие как MeTHF (метилтетрагидрофуран), или смеси растворителей, такие как NBP/THF 2/1 об./об., который проиллюстрирован в данном документе. Такая промывка может происходить таким же образом, как указано выше в отношении реагентов для снятия защиты 126, 130, 134. Другими словами, первое количество растворителя для промывки можно добавлять в первый реактор 106, а затем последовательно пропускать через второй и третий реакторы 108, 112. Аналогично, второе и третье количество промывочного растворителя можно также пропускать через реакторы 106, 108 и 112. Данная стадия промывки может быть повторяющейся, так что может быть 5, 8 или 10 различных циклов промывки (либо с тем же количеством растворителя, либо с добавлением новых количеств растворителя в первый реактор каждый раз). (Не смотря на то, что в данном документе подробно не описано, стадия промывки может быть важной и ее можно выполнять после каждой стадии снятия защиты и связывания). Аналогичным образом можно также использовать коррекцию насоса для обеспечения приблизительной однородности каждого количества промывочного растворителя, добавляемого в реакторы.

Ссылаясь на фиг. 2, теперь будет описано связывание аминокислоты с использованием системы 100. С каждой из смол 116 снимали защиту, как указано выше (и необязательно промывали). Соответственно, показано, что смолы 116 содержат незащищенную N-группу 120a (но не защищенную N-группа 120, как показано на фиг. 1).

В первый реактор 106 добавляют первое количество аминокислоты "X" 150. Это представлено графически на фиг. 2 стрелкой. В варианте осуществления, показанном на фиг. 2, первое количество аминокислоты "X" 150 предварительно смешивали с первым количеством растворителя 152, а также с первым количеством других реагентов 154. Более конкретно, первое количество аминокислоты "X" 150 смешивали с другими реагентами 154 и растворителем 152 перед его добавлением в первый реактор 106. В других вариантах осуществления первый растворитель 152 и/или другие реагенты 154 также можно добавлять последовательно и/или одновременно в первый реактор 106 в дополнение к первому количеству аминокислоты "X" 150. В некоторых вариантах осуществления первое количество растворителя 152 может представлять собой DMF. В некоторых вариантах осуществления другие реагенты 154 представляют собой средства, которые "активируют" аминокислоту "X" 150 и/или незащищенную N-группу 120a и/или облегчают реакцию связывания. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления другими реагентами 154 могут быть DIC и Охума.

Сразу после добавления аминокислоты "X" 150 (и первого количества растворителя 152 и других реагентов 154) в первый реактор 106 может протекать реакция сочетания. Данная реакция происходит между незащищенной N-группой 120a и аминокислотой "X". По прошествии определенного периода времени (например, 30 минут или другого установленного периода времени, расчет/определение которого будет понятен специалистам в данной области) первое количество аминокислоты "X" 150 может быть удалено из первого реактора 106 (как показано стрелкой 160). В некоторых вариантах осуществления данное первое количество аминокислоты "X" 150 может быть перенесено во второй реактор 108. Первое количество растворителя 152 и/или других реагентов 154 также можно удалить из первого реактора 106 и перенести во второй реактор 108.

Попав во второй реактор 108, первое количество аминокислоты "X" (а также первый растворитель 152 и/или другие реагенты 154) может действовать для взаимодействия с незащищенной N-группой 120a во втором реакторе 108. Аналогичным образом, в первый реактор 106 можно добавить второе количество аминокислоты "X" 170. (Снова, данное второе количество аминокислоты "X" 170 можно предварительно смешивать с другими реагентами 154 и/или растворителем 152). По истечении определенного периода времени (например, 30 минут) первое количество аминокислоты "X" 150 можно удалить из второго реактора 108 (как показано стрелкой 164). Данное первое количество аминокислоты "X" 150 можно перенести из второго реактора 108 в третий реактор 112. Если использовали первое количество растворителя 152 и/или других реагентов 154, то они также будут удалены из второго реактора 108 и перенесены в третий реактор 112. Второе количество аминокислоты "X" 170 можно удалить из первого реактора 106 (как показано стрелкой 174). Данное второе количество аминокислоты "X" 170 можно перенести из первого реактора 106 во второй реактор 108.

Третье количество аминокислоты "X" 180 можно добавить в первый реактор 106. (Снова, данное третье количество аминокислоты "X" 180 можно предварительно смешивать с другими реагентами 154 и/или растворителем 152 и оно может быть из той же партии, что и первое количество 150 и/или второе количество 170.) Реакция происходит таким образом, что незащищенная N-группа 120a в первом, втором и третьем реакторах 106, 108, 112 взаимодействует с аминокислотой "X" и связывается с ней. После завершения данной реакции или по прошествии некоторого времени первое количество аминокислоты "X" можно удалить из третьего реактора 112 и отправить в отходы или рециклировать обратно в первый реактор 106 (как показано стрелкой 188). (Снова, такое рециклирование делает данную реакцию более похожей на периодическую и, следовательно, может быть менее желательной. Действительно, если необходим периодический режим, может быть более предпочтительно соединить реакторы параллельно). Аналогичным образом, второе количество аминокислоты "X" 170 можно перенести в третий реактор 112 (и оставить для реакции, как показано стрелкой 166), а первое количество аминокислоты "X" 180 можно перенести во второй реактор 108, а затем в третий реактор 112 (и оставить для реакции в каждом реакторе). При таком итеративном способе реакция протекает "последовательно", и первое, второе и третье количества аминокислоты "X" 150, 170, 180 проходят через реакторы 106, 108, 112. Таким образом, количества аминокислот 150, 170, 180, либо по отдельности, либо вместе, реагируют с незащищенными N-группами 120a и связывают аминокислоту "X" с незащищенными N-группами 120a в первом, втором и третьем реакторах 106, 108, 112.

В некоторых вариантах осуществления может быть выгодно фильтровать раствор перед его перемещением из одного реактора в следующий реактор (например, перед перемещением из первого реактора 106 во второй реактор 108 или из второго реактора 108 в третий реактор 112). Специалистам в данной области будет понятно, как может происходить такая фильтрация.

Следует понимать, что последовательное использование реакторов, как описано в данном документе, может обеспечить снижение количества растворителя, используемого для стадий снятия защиты и/или промывки. Например, при использовании традиционной периодической обработки, для реакции

снятия защиты потребуется 20% раствор пиперидина в DMF. Такой раствор будет разделен на 10 объемов, и каждый реактор периодического действия прореагирует с данным раствором 3 раза. В результате на каждый реактор будет использоваться около 30 л/кг. Тем не менее, если три реактора используются последовательно, как описано в данном документе, 20% раствор пиперидина в DMF все равно будет разделен на 10 объемов в зависимости от количества смолы в каждом реакторе и прореагирует 3 раза (итерации) в серии из трех реакторов. Для того, чтобы в реакторах 2 и 3 количество эквивалентов пиперидина было больше или равно количеству партии, можно использовать четвертую загрузку 10 л/кг. В данном случае общее количество раствора пиперидина составит  $40/3=13,3$  л/кг, что соответствует уменьшению в 2,25 раза.

Чем выше количество избыточных аминокислот и чем выше стоимость аминокислот, тем выгоднее использовать последовательно соединенные реакторы для реакций сочетания. Например, реагент для разъединения Lys20 IV может стоить около 20 долларов за грамм; таким образом, сокращение количества избыточных реагентов может привести к значительной экономии средств. Тем не менее, чем меньше количество избыточных эквивалентов, тем выгоднее проводить реакции сочетания параллельно вследствие удерживания реакционного раствора в смоле, предотвращая перенос процента избыточных эквивалентов в следующий реактор без разбавления. Если избыточные аминокислотные эквиваленты составляют около 2 или менее, и если они представляют собой стандартные недорогие аминокислоты, то авторы настоящего изобретения выбрали проведение реакций сочетания параллельно, а снятие защиты и промывание последовательно.

Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления, чем больше количество последовательно соединенных реакторов, тем меньше общего требуется растворителя и реагента на килограмм продукта. Это аналогично принципу проточной химии, согласно которому большее количество CSTR (непрерывных реакторов с мешалкой, соединенных последовательно) становится ближе к идеальному поршневному потоку. В некоторых вариантах осуществления считается, что три последовательных реактора могут быть оптимальными вследствие компромисса между сокращением отходов и стоимостью оборудования. Другими словами, могут быть разработаны варианты осуществления, в которых убывающая отдача достигается за счет последовательного включения более чем 3-5 реакторов. Для достижения такой же максимальной остаточной концентрации реагента в конце промывки можно использовать 3 последовательных реактора для сокращения потребности в растворителе вдвое по сравнению с однократной периодической обработкой. Естественно, могут быть разработаны и другие варианты осуществления, в которых используют более трех или более пяти реакторов. Могут быть разработаны дополнительные варианты осуществления, в которых последовательно используют два реактора.

В некоторых вариантах осуществления может быть необходимо измерить все заряды реагентов по массе и использовать систему управления распределением DeltaV (предоставленную компанией Emerson из Сент-Луиса, штат Миссури, США) (вместо пользовательских интерфейсов на базе Windows). Это связано с тем, что документация в DeltaV также выполняется автоматически, и система может создавать выполненные технологические регламенты. Кроме того, в системе DeltaV большую часть операций выполняют посредством удаленного доступа, который может осуществляться из любой точки мира, где есть Интернет. Систему DeltaV можно настроить на отправку описательных текстовых сообщений на мобильные телефоны операторов, химиков, инженеров и аналитиков, когда в процессе происходят важные стадии или когда что-то требует внимания, что впоследствии в большинстве случаев обрабатывается удаленно. Одна из распространенных проблем с лучшей коммерчески доступной технологией ТФСР для лабораторных исследований заключается в том, что системы управления выходят из строя, пропускают заправки или завершают работу с ошибкой в какой-то момент во время сборки пептида. Заправки реагентов пропускаются, так как они осуществляются через датчик уровня. Напротив, система может быть спроектирована таким образом, чтобы все заправки реагентов производились по массе с весов. Отдельные эксперименты часто нужно проводить более месяца, например, если пептид содержит более 30 аминокислот. Сбой в расчете аминокислот ближе к концу месячного эксперимента означает, что эксперимент необходимо начать заново, и месяц (или другое время, необходимое для синтеза) будет потрачен впустую вместе с потраченными впустую материалами. Этого гораздо меньше с автоматизацией DeltaV, потому что она разработана более надежной и прочной, поскольку она является отраслевым стандартом для производства GMP.

В дополнительных вариантах осуществления система может быть спроектирована для предоставления гораздо большего количества информации о процессе и понимания, чем другие коммерчески доступные установки для синтеза, благодаря своей онлайн-аналитике. Онлайн-ЖХ-МС (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия) пептида на смоле позволяет количественно определять конверсию реакции и кинетику для всех снятий защиты и сочетаний во всех параллельных реакторах одновременно. Синхронизация интегрирована с химическим процессом, поскольку та же система DeltaV, которая запускает процесс, также выполняет анализ в режиме онлайн. Соответственно, работникам может не понадобиться находиться в лаборатории для отбора и анализа проб для принятия решений о дальнейшей обработке.

Для получения онлайн-системы ЖХ-МС могут быть реализованы следующие стадии:

- 1) вытягивание 1,0 мл суспензии из полимерного реактора;
- 2) немедленное расщепление посредством TFA в небольшом реакторе (время от извлечения пробы до начала расщепления посредством TFA составляет около 2 мин);
- 3) разбавление раствора расщепленного пептида в разбавителе для ЖХ (жидкостной хроматографии) и перемешивание;
- 4) транспортировка раствора по лаборатории и установка на контуре ввода ЖХ (без пузырьков газа);
- 5) переключение контура для введения пробы в ЖХ;
- 6) смывание гранул отработанной смолы из реактора расщепления в отходы;
- 7) очистка пробоотборных клапанов и трубок растворителем.

Тем не менее, следует отметить, что для реализации данной онлайн-ЖХМС поток идет вертикально вверх через пробоотборные клапаны, так что они полностью заполняются без пузырьков газа. Два трехходовых клапана используют для переключения пробы суспензии из контура отбора проб и подачи ее в зону расщепления и снятия защиты. Приводы обоих клапанов соединены одним соленоидным воздуховодом, так что они переключаются точно в одно и то же время, что может быть важно для получения ровно 1 мл суспензии для каждой пробы. Затем суспензия полностью проходит через зону отбора проб, а затем продолжает двигаться в восходящем направлении за пределами пробоотборных клапанов. Это может быть важно для заполнения пробоотборных клапанов с иллюстративной плотностью суспензии, даже если вязкость и плотность суспензии в реакторе изменяются от одной стадии к другой и изменяется расстояние потока за клапанами. Трубка с пробой суспензии из реактора проходит вверх по всей длине до пробоотборных клапанов. Это важно для того, чтобы впоследствии трубка очищалась при перекачивании обратно в реактор в обратном направлении. Это сводит к минимуму унос и предотвращает твердые засорения. Растворитель используют для промывки пробоотборных клапанов каждый раз, когда тележка для разбавления заканчивает пробу. В противном случае они со временем забьются твердыми частицами. Растворитель поступает между пробоотборными клапанами и перистальтическим насосом в обратном направлении от клапанов, затем проталкивается вперед через клапаны. Масса растворителя полностью проникают в зону расщепления, каждый раз удаляя твердые частицы смолы. За клапанами суспензия продолжает течь в восходящем направлении. Поток в данном восходящем направлении достаточно длинный, поэтому имеется достаточный запас для обеспечения попадания иллюстративной пробы в контур для отбора проб, но предотвращения перемещения суспензии за вершину и ее течения обратно вниз. Если это произойдет, то она попадет в перистальтический насос, что может вызвать проблемы с уносом, а также измельчить смолу, создав проблемы с фильтрацией в реакторе. Перистальтический насос расположен за нисходящей частью контура отбора проб, а не выше по потоку от контура отбора проб. Когда он находится выше по потоку от контура для отбора проб, он создает проблемы переноса и измельчает смолу, вызывая проблемы с фильтруемостью реактора. Можно использовать клапан (который может быть изготовлен по индивидуальному заказу) с дополнительным отверстием, приваренным к корпусу, так что растворитель для разбавления поступает непосредственно на верхнюю часть шара и выталкивается вверх, что способствует полному смешению растворителя для разбавления с раствором для расщепления, а также разрушению слоя смолы, осевшего на шаре.

Ссылаясь теперь на фиг. 1 и 2 вместе, теперь будет описано добавление следующей аминокислоты в пептидную последовательность. Данная следующая аминокислота в последовательности может быть обозначена как "Z", что означает, что она может представлять собой любую необходимую аминокислоту (тогда как, как отмечалось выше, аминокислота "X" также может быть любой необходимой аминокислотой). Стадии и процессы, описанные выше, будут действовать для присоединения аминокислоты "X" к смоле. (Таким образом, аминокислота "X" становится первой аминокислотой в пептидной последовательности). Как только данная аминокислота "X" была присоединена к смолам, смолы в первом, втором и/или третьем реакторах 106, 108, 112 можно промыть растворителем. Данный растворитель, как правило, представляет собой тот же растворитель, который описан выше. Такая промывка может происходить последовательным (например, сериями) способом, описанным в данном документе. Так, например, первое дополнительное количество растворителя можно добавлять в первый реактор 106, перемешивать в первом реакторе 106, а затем переносить во второй реактор 108 (и использовать для промывки смолы во втором реакторе 108), а затем передавать в третий реактор 112. Аналогичным образом, сразу после удаления первого дополнительного количества растворителя из первого реактора 106 в первый реактор 106 можно добавить второе дополнительное количество растворителя (и пропущено через другие реакторы). (Третье количество дополнительного растворителя также можно пропускать через систему). Другими словами, стадия промывки может проходить в последовательности и таким образом, как описано выше.

После промывки реакторов 106, 108, 112 растворителем в первый реактор 106 можно добавить первое дополнительное количество реагента для снятия защиты, а затем (после определенного периода времени) перенести из первого реактора 106 и добавить во второй реактор 108. Данное первое дополнительное количество реагента для снятия защиты будет затем (после определенного периода времени) также удалено из второго реактора 108. Второе дополнительное количество реагента для снятия защиты добавляют в первый реактор 106, обеспечивают реакцию в течение определенного периода времени, а затем

удаляют из первого реактора 106 и переносят во второй реактор 108, обеспечивают реакцию в нем, а затем удаляют из второго реактора 108 (а затем добавляют в третий реактор 112 посредством способа, описанного в данном документе). Данные первое и второе дополнительные количества реагента для снятия защиты (и третье дополнительное количество реагента для снятия защиты), по отдельности или вместе, действуют для снятия защиты с защищенной N-группы аминокислоты "X" как в первом, так и во втором реакторах.

После данной реакции с реагентом для снятия защиты аминокислота "X" (которая присоединена к смоле) готова для соединения со следующей аминокислотой "Z" в необходимой последовательности. Таким образом, в порядке, описанном в настоящем документе, будут выполнены следующие стадии:

добавление первого количества аминокислоты "Z" в первый реактор 106;

перенос первого количества аминокислоты "Z" во второй реактор 108;

добавление второго количества аминокислоты "Z" в первый реактор 106, при этом первое и второе количество аминокислоты "Z", по отдельности или вместе, связывают аминокислоту "Z" с незащищенной группой N аминокислоты "X" в первом реакторе 106;

удаление первого количества аминокислоты "Z" из второго реактора 108; а также

перенос второго количества аминокислоты "Z" из первого реактора 106 во второй реактор 108; а также

удаление второго количества аминокислоты "Z" из второго реактора 108,

при этом первое и второе количества аминокислоты "Z", по отдельности или вместе, связывают аминокислоту "Z" с незащищенной группой N аминокислоты "X" во втором реакторе 108.

Специалистам в данной области будет понятно, что аминокислота "Z" также может реагировать с аминокислотой "X" в третьем реакторе 112 аналогичным образом с использованием данных серий реакторов и реагентов, при последовательном добавлении каждой аминокислоты. Следовательно, таким образом строится аминокислотная последовательность. Затем процесс повторяют итеративно для добавления следующей аминокислоты, следующей и т. д., что известно, как синтез ТФСР.

Ссылаясь теперь на фиг. 3, показан схематический вид другого варианта осуществления системы 300 для связывания аминокислоты "X" с защищенной N-группой, которая присоединена к смоле для синтеза пептидов. В частности, система 300 включает несколько резервуаров 301 для хранения, предназначенных для хранения некоторого количества аминокислот. В частности, каждая конкретная аминокислота, которая будет добавлена к пептидной цепи, может иметь свой собственный отдельный резервуар 301 для хранения. Кроме того, каждый резервуар 301 может иметь свой собственный насос 303, предназначенный для перекачивания аминокислоты (которая может быть растворена в растворе) из резервуара 301 для хранения в реактор 307 активации. В частности, насос 303 будет перекачивать раствор аминокислоты из резервуара 301 по линии 309 в линию 311 и в реактор 307. Специалистам в данной области будет понятно, как соединить данную трубку/трубопровод и насос 303 для выполнения данной передачи раствора аминокислоты из отдельных резервуаров 301 в реактор 307. На фиг. 3 показаны только 3 разных резервуара для аминокислот 301. При необходимости можно использовать большее количество.

Необязательно, к линии 309 и/или насосам 303 могут быть присоединены один или более датчиков 313 потока для измерения потока аминокислоты по линии (и в реактор 307), так что количество, скорость потока, время потока и т. д. могут быть отрегулированы при необходимости. Кроме того, можно использовать клапаны 317 для направления потока аминокислоты обратно в питающий сосуд 301 для заполнения насоса. Специалистам в данной области будет понятно, как использовать клапаны и/или инертизирующую вентиляционную систему 327, которая может также включать вентиляционное отверстие 329, а также переливные сосуды для обеспечения безопасности, если это необходимо.

Аналогичным образом, система 300 включает несколько резервуаров 353 для хранения, предназначенных для хранения некоторого количества других реагентов, таких как DIC, Охута и т. д., и других промысловых растворителей. Кроме того, каждый резервуар 353 может иметь свой собственный насос 355, предназначенный для перекачивания жидкости из резервуара 353 для хранения в активационный реактор 307 или любой из фильтрующих реакторов 306, 308, 312. Специалистам в данной области будет понятно, как соединить данную трубу/трубопровод и насосы 355 для осуществления данной передачи. На фиг. 3 показаны только 3 разных питающих резервуара 353. При необходимости можно использовать большее количество.

Необязательно, один или более датчиков 359 потока могут быть присоединены к линиям от насосов 355 для измерения потока по всей линии, так что количество, скорость потока, время потока и т. д. могут быть отрегулированы при необходимости. Кроме того, можно использовать клапаны 357 для направления обратного потока в питающий сосуд 353 для заливки насоса. Специалистам в данной области будет понятно, как использовать клапаны и/или систему 363 инертизации, которая может также включать в себя вентиляционный барботер 361, а также переливные сосуды для обеспечения безопасности, если это необходимо.

Как отмечалось выше, система 300 включает реактор активации 307. Реактор 307 активации обычно располагается перед первым реактором 306, вторым реактором 308 и третьим реактором 312. Реактор 307 активации может дополнительно включать мешалку 333, предназначенную для смешивания содержи-

го (раствора) внутри реактора 307 активации. Кроме того, в реактор 307 активации также может быть добавлен датчик 335 температуры. Также может быть (необязательно) включен циркуляционный насос 341, связанный с оболочкой 345.

Реактор 307 активации может быть сконструирован таким образом, чтобы "активировать" раствор аминокислоты посредством предварительного смешивания раствора аминокислоты с DIC и Охума. Специалистам в данной области будет понятно, как такая добавка DIC и Охума (и/или растворителя и некоторого другого активирующего средства и основания) может быть добавлена в реактор 307.

Система 300 также включает сосуд 371 с раствором для снятия защиты, в котором находится реагент для снятия защиты. (В варианте осуществления, показанном на фиг. 3, реагентом для снятия защиты является пиперидин, хотя можно использовать и другие материалы). Один или более клапанов 369 и насос 365 могут быть предназначены для перекачки реагента для снятия защиты (по линиям 367) в первый реактор 306 (по входной линии 379). К линии 367 может быть дополнительно добавлен предохранительный клапан 381. Кроме того, внутри сосуда 371 может дополнительно использоваться датчик 385 давления. При необходимости можно использовать дополнительные клапаны 383 как часть системы вентиляции сосуда 371.

Сосуд 371а для хранения, используемый для растворителя (в данном случае он может представлять собой DMF или какой-либо другой растворитель), также может использоваться в качестве части системы 300. Сосуд 371а для хранения может включать (необязательно) датчик 373 давления для измерения давления растворителя. Один или более клапанов 375 и насос 377 можно применять для доставки сосуда 371а для растворителя. Растворитель подают в реактор активации 307, первый реактор 306, второй реактор 308 или третий реактор 312 по линиям 381. Датчик 383 расхода можно применять (необязательно) для измерения данного расхода по линии 381. При необходимости можно использовать дополнительные выпускные клапаны 386.

Как и в вариантах осуществления, описанных выше, первый, второй и третий реакторы 306, 308, 312 содержат определенное количество смолы (например, смолы Зибера), помещенной в них, и расположены последовательно после реактора 307 активации. Данные реакторы могут включать, в целях безопасности, подачу инертного азота с измерением свободного пространства над продуктом 403 и одну или более вентиляционных переливных емкостей 401. Могут быть разработаны другие вентиляционные отверстия и/или меры безопасности, как будет понятно специалистам в данной области.

Как отмечалось выше, раствор растворителя подключен через одну или более линий 381 к каждому из первого, второго и третьего реакторов 306, 308, 312, а также к реактору 307 активации. Один или более клапанов 405 могут регулировать поток растворителя в каждый из данных сосудов. В других вариантах осуществления точка входа растворителя в каждый из данных реакторов может представлять собой "распылительный шар" или другое устройство распыления, которое позволяет эффективно вводить растворитель в сосуд, а также позволяет растворителю "смыть" стенки сосуда (и любые твердые вещества, которые могут быть размещены на них), тем самым обеспечивая надлежащее смешивание и воздействие на всю оболочку реагентов и растворителей для промывки. (Действительно, между добавлением каждой конкретной аминокислоты, если смолы в реакторах 306, 308 и 312 "промываются", обычно рекомендуется опрыскивать реакторы 306, 308 и 312 растворителем указанным способом).

Как отмечалось выше, раствор, выходящий из реактора 307 активации, будет выходить через выходное нижнее отверстие и подсоединенную трубку. В потоке данной выходной линии могут дополнительно находиться датчик 409 расхода, один или более клапанов 411, контролирующих поток, а также насос 413. Кроме того, выпускная линия может включать один или более клапанов 415, которые позволяют автоматике выборочно управлять потоком раствора по линиям таким образом, чтобы раствор можно было направить в отходы 419 или в первый, второй и/или третий реакторы 306, 308, 312. (Как правило, система 300 будет работать таким образом, что второй и третий реакторы 308, 312 будут расположены последовательно с первым реактором 306, так что поток сначала пойдет к первому реактору 306, но клапан 415 (который может представлять собой 3-ходовой клапан (или 2-ходовой клапан, или 4-ходовой клапан и т. д.), позволяя пользователю контролировать данный поток и изменять его, если это необходимо).

Первый, второй и третий реакторы 306, 308 и 312, используемые в данной системе 300, аналогичны и/или идентичны описанным выше. Каждый из данных реакторов 306, 308 и 312 может дополнительно включать мешалку 421 и датчик 423 температуры. Реакторы первого, второго и третьего реакторов 306, 308 и 312 содержат смолы, которые будут служить субстратом для построения пептида. Данная смола будет включать защищенную N-группу, которая может быть удалена с использованием реагента для снятия защиты из сосуда 371, а затем прореагирует с раствором активированной аминокислоты (который был активирован в реакторе 307), тем самым связывая данную аминокислоту с последовательностью/смолой (с использованием методик ТФСР).

Выполняя такие стадии последовательно, можно при необходимости добавлять различные аминокислоты из резервуаров 301.

Как описано выше, первый реактор 306, второй реактор 308 и третий реактор 312 могут быть расположены последовательно. Соответственно, первое количество активированной аминокислоты подвер-

гается реакции в первом реакторе 306, а затем данные количества последовательно направляются во второй и третий реакторы 308, 312 (и новое количество активированного раствора добавляется в первый реактор 306) посредством способа, изложенного выше. Для облегчения данного потока, каждый реактор 306, 308, 312 может включать фильтр 427 для гарантии того, что гранулы твердой пептидной смолы и/или образующий твердое вещество пептид остаются в реакторах 306, 308, 312. Датчики 433 потока, клапаны 437 и насосы 435 могут использоваться необязательно и/или по мере необходимости для направления данного "последовательного" потока между первым, вторым и третьим реакторами 306, 308, 312. Аналогичным образом, устройство 441 для отбора проб может быть расположено в любом месте системы (или несколько устройств 441 для отбора проб при необходимости) для отбора проб того, что проходит через систему 300, для обеспечения того, что она работает правильно, или для проверки потока отходов, для определения того, что промывка является достаточной.

Следует отметить, что в варианте осуществления, показанном на фиг. 3, клапаны 437 могут быть сконструированы таким образом, что выход из первого, второго и третьего реакторов 306, 308, 312 может проходить последовательно сериями и/или может направляться в отходы 419. Это делается для того, чтобы автоматика могла управлять необходимым потоком. Кроме того, на фиг. 3 показана выходная линия из третьего реактора 312, идущая к отходам 419. Как отмечалось выше, варианты осуществления могут быть разработаны таким образом, что если реакторы 306, 308 и 312 и/или реактор активации 307 промываются растворителем, растворитель повторно используется (и направляется обратно в реакторы), тем самым делая систему более экологичной. Аналогичным образом раствор активированной аминокислоты может протекать через первый, второй и третий реакторы 306, 308 и 312, а затем снова возвращаться (множественно, при необходимости) через те же реакторы (и/или реактор активации 307), что и средство повторного проведения реакции (но при необходимости реакции лучше проводить параллельно). Например, в промежутках между добавлением каждой конкретной аминокислоты, когда смолы "промываются", обычно данная промывка происходит в 10 различных стадий промывки. В таком случае первые 2-8 промывок могут выполняться с предварительно использованным растворителем, так как, несмотря на то, что данный растворитель может содержать примеси, он достаточно "чист" для первой партии промывок, за которой следуют последние промывки (от 2 до 8 промывок) чистым растворителем. Раствор для промывки от последних 2-8 промывок собирают в рециркуляционном сосуде для использования в первых 2-8 промывках следующего цикла. Таким образом, количество растворителя, используемого во время всего процесса промывки, уменьшается).

Ссылаясь теперь на фиг. 4, показана система 500, которая представляет собой онлайн-систему ЖХ-МС, которую можно использовать в сочетании с вариантами осуществления, показанными на фиг. 1-3. В частности, система 500 предназначена для проведения измерений растворов и проб твердофазных пептидов, связанных со смолой, в реакторах, описанных выше, тем самым предоставляя оператору информацию в режиме реального времени о том, что происходит в системе.

Система 500 включает резервуар 503 с раствором для отщепления. Во многих вариантах осуществления данный раствор для отщепления представляет собой TFA, который предназначен для отщепления образованного пептида от смолы (и, таким образом, вытягивания образованного пептида из смолы). TFA также может гасить реакции сочетания. Клапаны 518p, 518q и 518s, как показано на фиг. 4, работают для управления потоком раствора TFA (или раствора для отщепления) в систему. Также может иметься переливная зона 507 для отщепления, которая включает линии 508 вместе с переливными сосудами 509 и измерительную зону 511 (вместе с клапаном 518g, соединенным с подачей 522 азота). Данная система 507 предназначена для отмеривания необходимого количества TFA и возврата всего избытка обратно в сосуд 503 для хранения. Специалистам в данной области будет понятно, как реализовать данные функции безопасности и/или функции потока для управления потоком раствора TFA. Это может включать использование одного или более клапанов 518.

Система 500 также включает смесительный бак 510 (который может представлять собой сосуд объемом 500 мл). В смесительный бак 510 может поступать образец суспензии из растворителя реактора (который может представлять собой DMF) из линий 512 для растворителя, которые регулируются клапанами 518a. Данные линии 512 (вместе с клапанами 518b и 518a) позволяют извлекать суспензию из реакторов (будь то реактор активации или первый, второй или третий реакторы, описанные выше). Линии 512 могут иметь внутренний диаметр 1/8 дюйма и внешний диаметр 1/4 дюйма. Линии 512 и клапаны 518a и 518b также позволяют подавать газ (из источника 522 азота) в систему, а также использовать цикл "откачки". Клапаны 518a также позволяют материалу течь к возврату реактора 524 и из реактора 525. Клапан 518b позволяет получать DMF (растворитель) из коллектора 526, при необходимости. Назначение линий 512 заключается в отборе пробы реакционной суспензии (например, 1 мл) для обеспечения возможности его добавления в бак 510. Клапаны можно использовать для обеспечения вытекания материала из реактора 525 (и, при необходимости, его протекания в восходящем направлении), чтобы суспензия не достигала насоса, предотвращая измельчение шариков смолы. Соответственно, посредством переключения клапанов и использования азота суспензия может быть извлечена, а остаток возвращен в реактор 525 посредством обратного откачивания без измельчения смолы в насосе. Специалистам в данной области будет понятно, как это осуществить.

В дополнение к пробе суспензии в смесительный бак 510 поступает еще одна подача из источника разбавителя 520, который будет добавлять растворитель или другие материалы для разбавления пробы объемом 1 мл по мере необходимости. Данная подача разбавителя 520 соединена со смесительным баком по линиям 528. Можно также использовать систему 527 перелива разбавителя. Данная система 527 может также включать зону 529 перелива разбавителя, которая включает линии 528 вместе с переливными сосудами 529 и измерительную зону 521 (вместе с клапанами 518e и 518l, соединенными с азотом). Клапан 518h регулирует поток в переливной сосуд 529. Данная система 527 перелива разбавителя предназначена для отмеривания необходимого количества разбавителя и возврата всего излишка обратно в емкость 520 для хранения. Специалистам в данной области будет понятно, как реализовать данные функции безопасности, а также контролировать поток раствора разбавителя.

Попав в смесительный бак 510, расщепленный и разбавленная проба будет течь по линии 540 к клапану 518m. По данной линии 540 материал (который обычно представляет собой пептид или растущую аминокислотную последовательность, отщепленную от смолы) поступает на ВЭЖХ 544 для анализа. Емкость 541 для хранения (которая может представлять собой емкость на 300 мл) может использоваться перед ВЭЖХ для отделения пузырьков газа от жидкости под действием силы тяжести и хранения пробы по мере необходимости.

Смесительный бак 510 может быть присоединен к линии 550 (и клапану 518j) для вентиляции смесительного бака 510 при необходимости. Датчики 551, такие как датчики давления или температуры (или другие датчики), могут измерять условия в данной линии (или вообще в системе, если они размещены в других местах в системе 500). Датчик 551 давления используется в автоматизированной последовательности в качестве индикатора перехода к следующей стадии.

Как правило, после 30 мин перемешивания в смесительном баке 510 для обеспечения времени для снятия защиты с пептида (и после разбавления), материал может быть извлечен из смесительного бака 510 по линии 555 и оставлен на клапане 518k или рядом с ним. Как только данный клапан 518k открыт, жидкие и/или отработанные гранулы смолы могут течь по линии 555 в отходы 546. Каустический барботер 557 можно применять в качестве предохранительного механизма для очистки любой ТФА, которая может находиться в линии 555. При необходимости азот или другой газ можно добавлять посредством линии 561 и клапана 562 к отходам 546 для облегчения данной очистки. Также могут быть добавлены другие функции безопасности, такие как ловушка 569 конденсата. Ловушка 569 конденсата сконструирована таким образом, чтобы жидкость барботера не могла всасываться обратно в систему. Как показано на фиг. 4, данная ловушка 569 для конденсата также может быть соединена посредством линии 580 с источником азота 581, который подает азот или другой газ для поддержания инертности 569, 546 и 557.

Специалистам в данной области будет понятно, как часто следует отбирать пробы из реакторов с использованием системы 500, показанной на фиг. 4. В некоторых вариантах осуществления в ходе реакции связывания отбор проб может происходить через регулярные интервалы времени, например, каждые 45 мин. В других ситуациях отбор проб может происходить с другими интервалами, например, каждые 60 мин или во время стадий промывки. Конечно, специалисты в данной области могут разработать другие частоты отбора проб.

В других вариантах осуществления отбор проб из реактора активации может происходить автоматически до того, как содержимое реактора активации будет добавлено в первый реактор. Это делается для проверки того, что аминокислота, которая была добавлена в реактор активации (и впоследствии будет добавлена в первый, второй и третий реакторы), является необходимой аминокислотой, например, следующей аминокислотой в последовательности. Причина этого заключается в том, что, например, если 25 аминокислот уже прореагировали между собой и добавлена "неправильная" аминокислота, то вся последовательность пептида будет неправильной и синтез пептида придется полностью переделать (с самого начала). Таким образом, для предотвращения данной ошибки аминокислоту автоматически отбирают до того, как она будет включена в реакцию связывания, тем самым сводя к минимуму вероятность того, что будет добавлена "неправильная" аминокислота.

Теперь будет сделана ссылка на фиг. 5, где показан вид в перспективе реакторов 106, 108 и 112, показанных на фиг. 1. Как видно на фиг. 5, смола 120 является пористой, так что часть раствора активированного сложного эфира (как указано в данном документе) может абсорбироваться в порах и продолжать реакцию, как показано в данном документе.

Еще одним аспектом настоящих вариантов осуществления является то, что онлайн-систему ЖХ-МС можно использовать с первым реактором. Она может представлять собой описанную в данном документе онлайн-систему ЖХМС, используемую с первым реактором системы с последовательно расположенными реакторами, описанными в данном документе. Могут быть разработаны другие варианты осуществления, в которых онлайн-систему ЖХ-МС используют с одним реактором, который в некоторых вариантах осуществления может представлять собой реактор периодического действия. Преимущество системы ЖХ-МС заключается в том, что точная проба (например, 1 мл) может быть извлечена автоматически в разное время в ходе реакции (например, в начале, середине и/или конце реакции). Пользователь может иметь возможность запрограммировать автоматическое извлечение пробы. Извлеченную пробу можно использовать для проверки того, как протекает реакция и завершена ли реакция. Такой отбор проб может

происходить в ходе стадии активации, стадии реакции и/или в ходе стадии(й) промывки. При использовании данной ЖХ-МС может не потребоваться критерий Кайзера (который обычно применяют для мониторинга процесса связывания пептидов) (таким образом экономятся затраты и время). Отбор проб может также обеспечивать мониторинг реакций в режиме реального времени, что может быть особенно ценным в производственных масштабах. Несмотря на то, что в настоящее время существуют пробоотборники, такие как пробоотборники Mettler Toledo, данное оборудование не использует с реакторами ТФСР и оно не включает устройства и способы для расщепления и снятия защиты, разбавления, смешивания, отделения от гранул отработанной смолы, транспортировки в ЖХ-МС и размещения на контуре переключения ЖХ-МС. Подробная процедура автоматизированной последовательности для онлайн-системы ЖХ-МС, показанная на фиг. 4, выглядит следующим образом.

Тележка 491: Последовательность для перистальтического отбора проб пептидного синтеза

Обновлено: 15 декабря 2020 г.

Начало посредством вентиляции.	Клапаны открыты:
Открыть 618A, 518k	[618A, 518k]
Ожидание введение времени пользователем «Vent PSI Read Dly»	
Ожидание PT < «Vent Low»	
Закрыть 618A, 518k	[ ]
Проба	
Открыть клапан 518j	[518j]
Команда запуска перистальтического насоса для проб “forward”	
Ожидание введения пользователем времени «Pump1 Time1»	
Команда остановки перистальтического насоса для проб	
Включение питания клапана 518a (трехходовые клапаны для пробы)	[518a, 518к]
Ожидание «AB open time»	
Отключение питания клапана А (возврат трехходовых клапанов к реактору/конвейеру)	[518j]
Команда изменения направления перистальтического насоса для проб на “backwards”.	
Ожидание введения пользователем времени «Pump1 CCW time»	
Команда остановки перистальтического насоса для проб	
Добавление раствора для отщепления	
Открыть 518r, 518s	[518j, 518r, 518s]
Ожидание 5 секунд для поднятия давления в бутылке с раствором для отщепления	
Закрыть 518r, 518s	[518j]
Открыть 518q	[518j, 518q]
Ожидание 5 секунд выхода раствора для отщепления из зоны измерения	
Закрыть 518q	[518j]
Открыть 518r	[518j, 518p]
Время ожидания введения пользователем времени «P Open Time»	
Закрыть 518r	[518j]
Открыть 518r, 518s	[518j, 518r, 518s]
Время ожидания введения пользователем времени «S Open time»	
Закрыть 518s	[518j, 518r]
Открыть 518q	[518j, 518q, 518r]
Время ожидания введения пользователем времени «Q Open time»	
Закрыть 518r, 518кв	[518j]
Снятие защиты	
Ожидание «Deprotect Time»	
В ожидании	

Каждое «Mix Delay Time» (вводимый пользователем параметр)	
Открыть клапан L, 618A	[518j, L, 618A]
Ожидание «Mixing Time» (вводимый пользователем параметр)	
Закрыть клапан L, 618A	[518j]
Закрыть клапан 518j	[ ]
Отмерить разбавитель	
Открыть G	[G]
Ожидание ввода пользователем времени «G Open Time»	
Закрыть G	[ ]
Открыть 518e, 518h	[518e, 518h]
Ожидание ввода пользователем времени «DEN Open Time»	
Закрыть 518h	[518e]
Открыть 518g, 518q для создания давления в смесительном баке	
	[518e, 518q, 518r]
Ожидание PT > Mix Pot Close	
Закрыть 518p, 518кв	[518e]
Открыть M1, M2	[518e, M1, M2]
Ожидание PT < LVS Empty / M2 Cls	
Закрыть M1 M2	[518e]
Смешивание отщепленной пробы и разбавителя	
Открыть клапан 618a	[518e, 618a]
Ожидание PT > введение пользователем установленного значения «Mix Pot Close».	
Закрыть клапан 618a	[518e]
Оседание	
Ожидание введения пользователем «settling time»	
Перенос в ВЭЖХ	
Открыть клапан M1	[518e, M1]
Ожидание PT < «M1 Close PSI»	
Закрыть клапан M1	[518e]
Слив оставшейся суспензии из смесительного бака	
Открыть 618a	[518e, 618a]
Ожидание PT > введение пользователем установленного значения «Mix Pot Close».	
Закрыть 618a	[518e]
Открыть 518k	[518e, 518k]
Ожидание считываний PT < «Vent Low»	

Закрыть 518k	[518e]
Если Agilent:	
Размещение пробы на ВЭЖХ	
Открыть 618a	[518e, 618a]
Ожидание PT > введение пользователем установленного значения «mix pressure» (то же установленное значение, что и выше).	
Открыть M1	[518e, 618A, M1]
Ожидание «M3 Open Delay»	
Открыть M3	[518e, 618A, M1, M3]
Ожидание «M3 Open Time»	
Закрыть M3, 618a, 518e, M1	[ ]
Сигнал для ВЭЖХ для отбора пробы	
Вентиляция	
Открыть 618a, 518q, 518k	[618a, 518k, 518q]
Ожидание введения пользователем «Vent PSI Read Dly»	
Ожидание считываний PT < «Vent Low»	
Закрыть 518к, 618a, 518к	[ ]
Ожидание следующей заданной пробы	
Промывка насоса	
Выполняется после последних проб сочетания или снятия защиты	
Включение питания клапана 518a (трехходовые клапаны в направлении смесительного бака)	[518a]
Открыть клапан 518b (DMF)	[518a, 518б]
Команда запуска перистальтического насоса «forward» в течение времени, введенного пользователем.	
Команда остановки перистальтического насоса для проб	
Закрыть клапан 518b	[518a]
Отключение питания клапана 518a (возврат трехходовых клапанов к реактору/конвейеру)	[ ]
Промывка клапана:	
Команда запуска перистальтического насоса для пробы в режиме «reverse» в течение 1 секунды.	
Команда остановки перистальтического насоса для проб	
Включение питания клапана 518a (трехходовые клапаны в направлении смесительного бака)	[518a]
Открыть клапан 518к	[518a, 518к]
Ожидание 5 секунд	
Закрыть клапан 518к	[518a]
Отключение питания клапана 518a (возврат трехходовых клапанов к реактору/конвейеру)	[ ]
Повторить промывку клапана 3 раза	
Команда запуска перистальтического насоса для пробы в режиме “reverse” в течение времени, введенного пользователем.	
Команда остановки перистальтического насоса для проб	

#### Пример 1. Конструирование тирзепатида посредством твердофазного пептидного синтеза (ТФСП).

Тирзепатид (фиг. 6) содержит основу из 39 аминокислот, синтез которых осуществляют посредством линейного твердофазного пептидного синтеза (ТФСП). Синтез тирзепатида осуществляют сначала посредством конструирования 39-мерного промежуточного соединения основной цепи, как показано на фиг. 7, с использованием способа последовательных реакторов, как описано ниже. Следует обратить внимание, что в ходе синтеза тирзепатида 39-мерное промежуточное соединение основной цепи (фиг. 7) присоединяется к твердой подложке (смола Зибера, как описано в данном документе) посредством групп-

пы -NH<sub>2</sub>, присоединенной к серину-39.

В табл. 1 указан порядок, в котором каждая из 39 аминокислот используется для построения тирзепатидного остова. Например, серин является первой аминокислотой, используемой в синтезе остова, при этом она представляет собой аминокислоту, присутствующую в положении 39 тирзепатида. Азот каждой аминокислоты, используемой в линейном ТФСП от Ser39 до Aib2, защищен 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой на α-азоте, за исключением Tyr1, который защищен трет-бутилоксикарбонилем (Boc) на α-азоте. Для защитных групп боковой цепи, как указано в табл. 1, кислород защищен трет-бутилом (tBu), а азот защищен тритилом (Trt), 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутилом (ivDde) или Boc.

Таблица 1

Порядок 39 аминокислот, используемых в конструкции тирзепатида посредством ТФСП

Порядок добавления аминокислоты (AA)	Положение AA на пептиде	Название AA	AA, используемая на стадии соединения
1	39	Серин	Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH
2	38	пролин	Fmoc-Pro-OH
3	37	пролин	Fmoc-Pro-OH
4	36	пролин	Fmoc-Pro-OH
5	35	аланин	Fmoc-Ala-OH
6	34	Глицин	Fmoc-Gly-OH
7	33	Серин	Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH
8	32	Серин	Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH
9	31	пролин	Fmoc-Pro-OH
10	30	Глицин	Fmoc-Gly-OH
11	29	Глицин	Fmoc-Gly-OH
12	28	аланин	Fmoc-Ala-OH
13	27	изолейцин	Fmoc-Ile-OH
14	26	Лейцин	Fmoc-Leu-OH
15	25	Триптофан	Fmoc-Trp(Boc)-OH
16	24	глутамин	Fmoc-Gln(Trt)-OH
17	23	валин	Fmoc-Val-OH
18	22	Фенилаланин	Fmoc-Phe-OH
19	21	аланин	Fmoc-Ala-OH
20	20	Лизин-ivDde	Fmoc-Lys(ivDde)-OH
21	19	глутамин	Fmoc-Gln(Trt)-OH
22	18	аланин	Fmoc-Ala-OH
23	17	изолейцин	Fmoc-Ile-OH
24	16	лизин	Fmoc-Lys(Boc)-OH
25	15	аспарагиновая кислота	Fmoc-Asp( <i>t</i> Bu)-OH
26	14	Лейцин	Fmoc-Leu-OH
27	13	2-аминоизомасляная кислота	Fmoc-Aib-OH
28	12	изолейцин	Fmoc-Ile-OH
29	11	Серин	Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH
30	10	Тирозин	Fmoc-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH
31	9	аспарагиновая кислота	Fmoc-Asp( <i>t</i> Bu)-OH
32	8	Серин	Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH
33	7	Треонин	Fmoc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH
34	6	Фенилаланин	Fmoc-Phe-OH
35	5	Треонин	Fmoc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH
36	4	Глицин	Fmoc-Gly-OH
37	3	Глутаминовая кислота	Fmoc-Glu( <i>t</i> Bu)-OH
38	2	2-аминоизомасляная кислота	Fmoc-Aib-OH
39	1	Вос-тирозин	Boc-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH

Способ последовательного включения реакторов.

Готовят 20-процентный раствор пиперидина в DMF следующим образом: разбавляют пиперидин (800 мл) до объема 4,0 л посредством добавления DMF с получением 20% раствора по объему.

Готовят 0,68 М раствор Охута в DMF следующим образом: растворяют этил(гидроксимино)цианоацетат (Охута, 386,85 г, 2,722 моль) в DMF до объема 4,0 л с получением

0,68 М раствора, затем через раствор барботируют азот при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят 0,60 М раствор DIC в DMF следующим образом: растворяют N,N'-диизопропилкарбодиимид (340,8 г, 2,700 моль) в DMF до объема 4,5 л с получением 0,60 М раствора, затем пропускают через раствор азот при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят 0,375 М раствор серина в DMF следующим образом: растворяют FMOC-Ser(tBu)-OH (431,3 г, 1,318 моль) в DMF до объема 3,0 л посредством DMF, встряхивают для растворения, а затем барботируют азотом через раствор при 2 стандартных кубических футах в час. Аналогичным образом готовят 0,375 М растворы каждой из аминокислот, указанных в табл. 1.

Готовят реакционную систему следующим образом: оборудуют три реактора одинакового размера сетчатыми фильтрами для удержания твердой смолы при откачивании раствора. Реакторы помечают как "RB1", "RB2" и "RB3" и добавляют смолу Зибера (500 г, 0,70 ммоль/г, 350 ммоль), поровну разделив между реакторами. Добавляют 1500 мл DMF в каждый реактор и перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч для набухания смолы.

Общая процедура А - процесс снятия защиты с F-мос и промывки DMF.

К RB1 добавляют раствор пиперидина (20 об.% в DMF, 1365 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин. Перекачивают раствор пиперидина из RB1 в RB2, затем загружают RB1 другой порцией раствора пиперидина (20 об.% в DMF, 1386 мл) и перемешивают реакторы RB1 и RB2 в течение 30 мин. В конце времени перемешивания перекачивают раствор пиперидина из RB2 в RB3, перекачивают раствор пиперидина из RB1 в RB2, а затем в RB1 загружают другую порцию раствора пиперидина (20 об.% в DMF, 1407 мл). Перемешивают все три реактора в течение 30 мин при комнатной температуре. Перекачивают раствор пиперидина из RB3 в отходы, затем перекачивают раствор пиперидина из RB2 в RB3, затем перекачивают раствор пиперидина из RB1 в RB2. Перемешивают RB2 и RB3 при комнатной температуре в течение 30 мин. Перекачивают раствор пиперидина из RB3 в отходы, затем перекачивают раствор пиперидина из RB2 в RB3. Перемешивают RB3 при комнатной температуре в течение 30 мин, затем перекачивают раствор пиперидина из RB3 в отходы. Таким образом, раствор пиперидина прокачивают последовательно через три реактора три раза и каждый раз перемешивают в течение 30 мин.

После того, как все три порции раствора пиперидина были перемешаны во всех трех реакторах и в сборник отходов, добавляют DMF (1218 мл) в RB1 и перемешивают в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем перекачивают растворитель из RB1 в RB2 и добавляют DMF (1208 мл) в RB1. Перемешивают оба сосуда при комнатной температуре в течение 5 мин. Перекачивают растворитель из RB2 в RB3 и из RB1 в RB2. Добавляют DMF (1758 мл) в RB1 и перемешивают все три сосуда при комнатной температуре в течение 5 мин. Повторяют эту же процедуру до тех пор, пока растворитель DMF не будет прокачан последовательно через три реактора (каждый раз перекачивая растворитель DMF из RB3 в отходы) в общей сложности восемь промывок на реактор с использованием в общей сложности 12,66 л (11,95 кг) DMF. Средний объем промывки DMF составляет 1580 мл. Целевой объем промывки составляет 1400 мл на промывку, поэтому для последующих аминокислот в синтезе пептида следует отрегулировать давление насоса и питающего резервуара так, чтобы последующие загрузки были ближе к 1400 мл.

Общая процедура В - активация аминокислот и процесс связывания.

В реактор с рубашкой, обозначенный "RA", добавляют раствор серина (0,375 М в DMF, 774 г), раствор Охута (0,68 М в DMF, 422 г), а затем раствор DIC (0,60 М в DMF, 506 г). Перемешивают раствор при 15°C в течение 30 мин с получением раствора активированного серина, затем добавляют данный раствор в RB1. Повторяют данный процесс для получения раствора активированного серина в реакторе RA и добавляют его в RB2, затем повторяют процесс еще раз и добавляют раствор активированного серина в RB3. Каждый из 3 реакторов имеет общий объем суспензии около 2200-2300 мл в ходе реакций сочетания, что равняется раствору активированного сложного эфира плюс объем набухшей смолы. Перемешивают реакторы RB1, RB2 и RB3 при комнатной температуре в течение 8 ч, затем сливают растворитель из всех трех реакторов.

Реакторы RA, RB1, RB2 и RB3 последовательно промывают растворителем DMF, как в общей процедуре А, всего 7 промывок на каждый реактор. Первые 3 промывки подаются на распылительный шар в RA, прежде чем они подаются в RB1. Следовательно, первые 3 промывки последовательно проходят через RA, RB1, RB2 и RB3. Тем не менее, при откачивании каждой промывки из RA небольшую часть промывочного растворителя перекачивают из RA в RB3 (~30 мл), затем небольшую часть промывочного растворителя перекачивают из RA в RB2 (~30 мл), затем большую часть растворителя в RB1 (~ 1340 мл), затем прокачивают очистку трубки между RA и RB3 и прокачивают очистку трубки между RA и R2. При этом промываются и очищаются передаточные трубки и клапаны между RA и каждым из полимерных реакторов. Затем для промывки с 4-й по 7-ю через распылительный шар RB3 закачивают небольшую порцию растворителя DMF (100 мл), затем через распылительный шар RB2 (100 мл) закачивают небольшую порцию растворителя DMF, затем через распылительный шар RB1 закачивают 1400 мл растворителя DMF. Цель заключается в смывании твердых частиц смолы со стенок каждого реактора. Общее количество растворителя, используемого для промывки после связывания, составляет 10,69 л (10,09 кг). Для более поздних аминокислот в синтезе 39-мерного пептидного скелета количество DMF, распыляемого на

RB2 и RB3 через распылительные шары, уменьшается до ~50 мл.

Для каждой аминокислоты, указанной в табл. 1, от пролина 38 до Вос-тирозина 1, проводят снятие Fmoc-защиты с ранее связанной аминокислоты, используя общую процедуру А, с последующим связыванием, используя общую процедуру В. Для связывания серина 39, а также следующих 38 аминокислот, следует использовать общую процедуру В со стехиометрией, указанной в табл. 2. Если указано в табл. 2, следует приготовить дополнительное количество активированного эфира и повторно соединить со стехиометриями, указанными в табл. 2, в соответствии с общей процедурой В. Перемешивают реакции сочетания до достижения конверсии более 99%.

Таблица 2  
Молярные эквиваленты аминокислот, Охута и DIC  
в каждом реакторе по отношению к смоле

	эквиваленты AA в RB1	эквиваленты Охута в RB1	эквиваленты DIC в RB1	эквиваленты AA в RB2	эквиваленты Охута в RB2	эквиваленты DIC в RB2	эквиваленты AA в RB3	эквиваленты Охута в RB3	эквиваленты DIC в RB3
Ser в 39	2,46	2,61	2,82	2,46	2,40	2,77	2,49	2,40	2,76
Pro в 38	1,48	1,47	1,67	1,47	1,43	1,68	1,48	1,44	1,69
Повторное сочетание Pro38	0,49	0,52	0,55	0,49	0,50	0,57	0,50	0,51	0,57
Pro в 37	1,53	1,49	1,65	1,53	1,49	1,65	1,51	1,51	2,77
Pro в 36	1,47	1,52	1,65	1,47	1,52	1,65	1,49	1,53	1,67
Повторное сочетание Pro36	0,98	0,97	1,08	0,98	0,99	1,10	0,99	0,99	1,11
Ala в 35	0,00	1,48	1,63	1,51	1,49	1,64	1,48	1,52	1,69
Повторное сочетание Ala35	0,96	0,99	1,09	0,97	1,00	1,10	0,98	1,01	1,12
Gly в 34	1,47	1,51	1,66	1,45	1,49	1,65	1,52	1,52	1,70
Повторное сочетание Gly34	1,00	0,98	1,11	0,99	0,98	1,11	1,02	1,01	1,13
Ser в 33	1,50	1,50	1,64	1,51	1,49	1,64	1,55	1,53	1,68
Ser в 32	1,48	1,45	1,62	1,49	1,47	1,62	1,49	1,47	1,63
Повторное сочетание Ser32	0,49	0,48	0,54	0,50	0,48	0,54	0,50	0,48	0,54
Pro в 31	1,46	1,45	1,61	1,46	1,46	1,61	1,48	1,48	1,65
Повторное сочетание Pro31	0,97	0,99	1,09	0,97	0,99	1,09	0,98	0,99	1,10
Gly в 30	1,43	1,46	1,64	1,44	1,46	1,63	1,49	1,48	1,66
Повторное сочетание Gly30	0,98	0,97	1,08	0,97	0,98	1,10	1,00	0,99	1,12
Gly в 29	1,46	1,46	1,60	1,47	1,46	1,60	1,52	1,51	1,65
Повторное сочетание Gly29	0,98	0,99	1,10	0,98	0,98	1,08	1,00	1,00	1,12
Ala в 28	1,50	1,45	1,59	1,51	1,46	1,60	1,54	1,51	1,66
Повторное сочетание Ala28	1,00	0,97	1,07	1,01	0,97	1,08	1,03	1,01	1,12
Pe в 27	0,00	1,45	1,61	1,44	1,47	1,61	1,53	1,51	0,00
Повторное сочетание Pe27	0,99	0,96	1,10	0,99	0,99	1,09	1,03	1,03	1,14
Leu в 26	1,48	1,45	1,62	1,47	1,47	1,61	1,55	1,52	1,68
Повторное сочетание Leu26	1,00	0,97	1,09	1,00	0,98	1,08	1,05	1,02	1,14
Trp в 25	1,52	1,47	1,60	1,52	1,46	1,61	1,60	1,54	1,71
Gln в 24	1,44	1,50	1,60	1,47	1,51	1,61	1,56	1,59	1,71

## 048130

Повторное сочетание Gln24	1,46	1,49	1,59	1,47	1,49	1,60	1,55	1,58	1,70
Val в 23	1,80	1,48	1,62	1,51	1,48	1,61	1,72	1,60	1,71
Повторное сочетание Val23	1,44	1,48	1,62	1,47	1,49	1,63	1,51	1,58	1,71
Phe в 22	1,67	1,46	1,59	1,22	1,49	1,61	1,39	1,59	1,72
Повторное сочетание Phe22	1,52	1,47	1,62	1,45	1,49	1,64	1,46	1,60	1,74
Ala в 21	1,46	1,50	1,66	1,49	1,52	1,67	1,52	1,54	1,69
Повторное сочетание Ala21	1,38	1,51	1,65	1,50	1,54	1,66	1,62	1,54	1,68
Lys-ivDde в 20	1,49	1,52	1,68	1,58	1,53	1,69	1,51	1,53	1,69
Повторное сочетание Lys-ivDde20	1,46	1,53	1,66	1,53	1,54	1,68	1,54	1,54	1,67
Gln в 19	1,42	1,45	1,56	1,51	1,53	1,67	1,48	1,50	1,63
Повторное сочетание Gln19	1,42	1,48	1,56	1,52	1,53	1,66	1,48	1,49	1,63
Ala в 18	1,43	1,45	1,57	1,55	1,57	1,68	1,62	1,50	1,65
Повторное сочетание Ala18	1,37	1,45	1,58	1,53	1,52	1,68	1,54	1,52	1,65
Ile в 17	1,36	1,38	1,54	1,45	1,45	1,52	1,38	1,41	1,55
Повторное сочетание Ile17	1,39	1,44	1,52	1,45	1,42	1,58	1,40	1,41	1,54
Второе повторное сочетание Ile17	1,40	1,37	1,51	1,45	1,43	1,58	1,39	1,36	1,50
Lys в 16	1,39	1,42	1,63	1,55	1,52	1,70	1,46	1,55	1,65
Повторное сочетание Lys16	1,43	1,48	1,64	1,47	1,54	1,71	1,43	1,52	1,65
Asp в 15	1,45	1,46	1,63	1,53	1,54	1,70	1,50	1,52	1,67
Повторное сочетание Asp15	1,47	1,49	1,62	1,54	1,54	1,72	1,50	1,51	1,67
Leu в 14	1,57	1,62	1,76	1,66	1,69	1,87	1,50	1,54	1,70
Aib в 13	1,54	1,53	1,77	1,61	1,70	1,88	1,46	1,57	1,70
Повторное сочетание Aib13	1,51	1,62	1,73	1,56	1,68	1,78	1,42	1,56	1,67
Ile в 12	1,69	1,82	1,93	1,61	1,75	1,85	1,48	1,61	1,67

Повторное сочетание Ile12	1,78	1,81	1,90	1,70	1,73	1,79	1,57	1,62	1,69
Второе повторное сочетание Ile12	1,78	1,79	1,86	1,70	1,76	1,81	1,57	1,59	1,87
Ser в 11	1,77	1,82	1,98	1,71	1,75	1,89	1,61	1,65	1,76
Повторное сочетание Ser11	1,80	1,77	1,92	1,73	1,71	1,84	1,62	1,61	1,73
Тур в 10	1,66	1,79	1,93	1,67	1,75	1,88	1,61	1,67	1,72
Повторное сочетание Тур10	1,77	1,82	1,96	1,68	1,65	1,66	1,60	1,67	1,79
Asp в 9	1,76	1,74	1,92	1,85	1,86	2,04	1,63	1,66	1,82
Повторное сочетание Asp9	1,76	1,76	1,92	1,85	1,89	2,01	1,64	1,65	1,79
Ser в 8	1,94	1,96	2,08	1,87	1,88	2,02	1,67	1,63	1,87
Повторное сочетание Ser8	1,94	1,94	2,10	1,87	1,88	2,04	1,67	1,66	1,85
Thr в 7	1,83	1,89	2,06	1,80	1,83	1,99	1,63	1,65	1,82
Phe в 6									
Thr в 5	1,75	1,69	1,91	1,88	1,92	2,03	1,57	1,62	1,72
Gly в 4	1,57	1,63	1,72	1,67	1,71	1,84	1,52	1,56	1,66
Повторное сочетание Gly4	1,60	1,62	1,68	1,68	1,71	1,80	1,52	1,58	1,64
Glu в 3	1,67	1,74	1,81	1,64	1,73	1,80	1,53	1,60	1,71
Повторное сочетание Glu3	1,65	1,72	1,81	1,63	1,75	1,80	1,52	1,56	1,69
Aib в 2	1,55	1,76	1,87	1,64	1,75	1,80	1,72	1,76	1,91
Вос-Тур в 1	1,57	1,71	1,83	1,66	1,73	1,80	1,77	1,83	2,00

После связывания используют в среднем 10 промывок DMF (см. табл. 8). В производственном цикле рекомендуется выполнить 7 промывок для экономии времени и растворителей.

Начиная с пролинового сочетания в положении 37, автоматически отбирают пробы для онлайн-ЖХ-МС. Автоматически отобранные пробы, содержащие твердую смолу, отбирают из RB3 через 15, 75, 180, 324, 503 и 684 мин. после стадии сочетания. Автоматически отобранные пробы также отбирают в разное время из RB3 на стадии снятия защиты. Для каждой пробы из реактора автоматическим насосом и клапанами отбирают пробу суспензии объемом 1,0 мл. Пробу разбавляют 25 мл TFA и периодически перемешивают в течение 30 мин реакции, отщепляя пептид от гранул смолы и удаляя защитные группы с пептида. Затем образец смешивают с 75 мл смеси 4:1 DMSO:ацетонитрил. Разбавленный раствор помещают в контур переключения ЖХ объемом 2 мкл и вводят в колонку.

Отрегулируйте количество 20% пиперидина в промывках DMF и время перемешивания для достижения конверсии не менее 99%, определенной посредством ЖХ-МС. Для Ser39-Leu26 время перемешивания 20% пиперидина в DMF составляет 30 мин; для Trp25 и Gln24 - 40 мин; для Val23 до Leu14 он составляет 50 мин. Для промывок Aib135 перемешивают в течение 50 мин. и еще 3 промывки перемешивают в течение 90 мин. Для остальных аминокислот (от Ile12 до Вос-Тур1) первые 3 промывки 20% пиперидином в DMF перемешивают в течение 20-30 мин, а затем в течение более длительного времени, когда 4<sup>-я</sup> промывка пиперидином последовательно поступает в первый реактор. Для Pro36 и Gly34 выполняют дополнительную стадию снятия защиты и промывки, как указано в общей процедуре А. Следует отметить, что обычно трех 30-минутных перемешиваний с 20% пиперидином в DMF достаточно для достижения конверсии не менее 99%, и это экономит время, растворители и реагенты в производственном цикле данной процедуры.

Регулируют количество промывок DMF после стадии снятия защиты с пиперидина для обеспечения того, что поток промывки содержит менее 600 ppm пиперидина с использованием анализа посредством газовой хроматографии (ГХ) перед проведением процедуры сочетания со следующей аминокислотой. Среднее количество промывок, используемых после стадии снятия защиты с пиперидина, составляет 11 промывок (см. табл. 7). Обычно это достигается за 10 промывок, поэтому рекомендуется в производственном цикле после стадий снятия защиты с пиперидина применять 10 промывок DMF.

В табл. 3 показано время отбора проб в ходе онлайн ЖХ-МС и рассчитанный % конверсии в ходе синтеза 39-мерного пептидного скелета. На фиг. 4 показана схема процесса и оборудования для автоматического отбора проб, расщепления, снятия защиты, разбавления и размещения тележки для онлайн-ЖХ-МС.

Таблица 3  
Образцы для онлайн-ЖХМС и конверсии реакции в %

Образец	% конверсии
75-минутное сочетание Pго в 37	94,5
180-минутное сочетание Pго в 37	99
300-минутное сочетание Pго в 37	99,8
498-минутное сочетание Pго в 37, отобранное в ходе промывки	99,6
Pго со снятой защитой в 37 лет после восьми 30-минутных промывок пиперидином	99,8
75-минутное сочетание Pго в 36	89,8
180-минутное сочетание Pго в 36	99,1
480-минутное сочетание Pго в 36	99,6
После 200-минутного повторного сочетания с дополнительным 1 экв.	99,6
После 216-минутного повторного сочетания с дополнительным 1 экв., отобранным в ходе промывки.	100
Pго со снятой защитой в 36 лет после восьми 30-минутных промывок пиперидином	99,7
75-минутное сочетание Ala в 35	70,9
280-минутное сочетание Ala в 35	99,2
После 121-минутного повторного сочетания с дополнительным 1 экв.	99,3
После 243-минутного повторного сочетания с дополнительным 1 экв.	99,2
Ala со снятой защитой в 35 после трех 30-минутных промывок пиперидином	99,4
Ala со снятой защитой в 35 через 15 минут после 4-й 30-минутной промывки пиперидином	99,8
Ala со снятой защитой в 35 через 15 минут после 6-й 30-минутной промывки пиперидином	99,9
Ala со снятой защитой в 35 после шести 30-минутных промывок пиперидином	100
15-минутное сочетание Gly в 34	36,6
75-минутное сочетание Gly в 34	65,5
180-минутное сочетание Gly в 34	98,7
360-минутное сочетание Gly в 34	99,3
После 15 минут повторного сочетания с дополнительным 1 экв.	100
После 60 минут повторного сочетания с дополнительным 1 экв.	100
Gly со снятой защитой в 34 через 15 минут после 3-й 30-минутной промывки пиперидином	99,5
240-минутное сочетание Ser в 33	100
360-минутное сочетание Ser в 33	99,7
453-минутное сочетание Ser в 33	99,6
466-минутное сочетание Ser в 33, проба в ходе промывки	99,9
120-минутное сочетание Ser в 32	99,2
240-минутное сочетание Ser в 32	98,9
360-минутное сочетание Ser в 32	100

После 15 минут повторного сочетания с дополнительным 0,5 экв.	100
После 60 минут повторного сочетания с дополнительным 0,5 экв.	100
После 110 минут повторного сочетания с дополнительным 0,5 экв.	100
После 2-часового повторного сочетания с дополнительным 0,5 экв., отобраным в ходе промывки.	100
Сер со снятой защитой в 32 через 15 минут после 3-й 30-минутной промывки пиперидином	99,3
Сер со снятой защитой в 32 через 15 минут после 5-й 30-минутной промывки пиперидином	99,4
Сер со снятой защитой в 32 после шести 30-минутных перемешиваний с пиперидином	99,3
60-минутное сочетание Pro в 31	74,6
110-минутное сочетание Pro в 31	93,2
180-минутное сочетание Pro в 31	99,8
240-минутное сочетание Pro в 31	99,7
15 минут в течение третьего 30-минутного снятия защиты с Pro в 31	99,5
15 минут в течение пятого 30-минутного снятия защиты Pro в 31	99,3
Pro со снятой защитой в 31 после восьми 30-минутных перемешиваний с пиперидином	99,5
60-минутное сочетание Gly в 30	55,6
120-минутное сочетание Gly в 30	70
180-минутное сочетание Gly в 30	101,9
240-минутное сочетание Gly в 30	98,2
360-минутное сочетание Gly в 30	98,4
После 85-минутного повторного сочетания с дополнительным 1 экв., отобраным в ходе промывки.	99,7
15 мин. в течение третьего 30-минутного снятия защиты Gly в 30	99
15 мин. в течение пятого 30-минутного снятия защиты с Gly в 30	99,5
Gly со снятой защитой в 30 после шести 30-минутных перемешиваний с пиперидином, пробы отобраны во время промывки	99,7
60-минутное сочетание Gly в 29	45,1
120-минутное сочетание Gly в 29	74,1
180-минутное сочетание Gly в 29	98,3
240-минутное сочетание Gly в 29	98,8
360-минутное сочетание Gly в 29	99,2
После 167-минутного повторного сочетания с дополнительным 1 экв., отобраным в ходе промывки.	99,4

## 048130

15 минут после третьего 30-минутного снятия защиты с Gly в 29	99,5
15 минут после пятого 30-минутного снятия защиты с Gly в 29	99,4
Gly со снятой защитой в 29 после восьми 30-минутных перемешиваний с пиперидином	99,6
60-минутное сочетание Ala в 28	52,4
120-минутное сочетание Ala в 28	78,2
180-минутное сочетание Ala в 28	98,1
240-минутное сочетание Ala в 28	98,4
360-минутное сочетание Ala в 28	98,9
После 120-минутного повторного сочетания с дополнительным 1 экв.	99,4
После 180-минутного повторного сочетания с дополнительным 1eq., отобранным взятые ходе промывки.	99,6
15 минут после пятого 30-минутного снятия защиты с Ala в 28	99,9
Ala со снятой защитой в 28 после восьми 30-минутных перемешиваний с пиперидином	99,9
60-минутное сочетание Pe в 27	72
120-минутное сочетание Pe в 27	91,4
180-минутное сочетание Pe в 27	97,7
240-минутное сочетание Pe в 27	98,6
360-минутное сочетание Pe в 27	99,1
5 минут после третьего 30-минутного снятия защиты с Pe в 27	99,8
5 минут после пятого 30-минутного снятия защиты с Pe в 27	100
Pe со снятой защитой в 27 после восьми 30-минутных перемешиваний с пиперидином	100
75-минутное сочетание Leu в 26	74,6
135-минутное сочетание Leu в 26	84,8
5 минут после третьего 30-минутного снятия защиты с Leu в 26	101,4
75-минутное сочетание Tgr в 25	100
135-минутное сочетание Tgr в 25	99,8
195-минутное сочетание Tgr в 25	100
255-минутное сочетание Tgr в 25	100
360-минутное сочетание Tgr в 25	100
391-минутное сочетание Tgr в 25, проба в ходе промывки	100
5 минут в ходе 2-го 40-минутного снятия защиты с Tgr в 25	97,4
5 минут в ходе 3-го 40-минутного снятия защиты с Tgr в 25	99,2
5 минут в ходе 5-го 40-минутного снятия защиты с Tgr в 25	98,7
Tgr со снятой защитой в 25 после шести 40-минутных перемешиваний с пиперидином	100,1

75-минутное сочетание Gln в 24	93,6
135-минутное сочетание Gln в 24	98,6
195-минутное сочетание Gln в 24	99,9
255-минутное сочетание Gln в 24	100
360-минутное сочетание Gln в 24	100
75-минутное сочетание Val в 23	93,8
135-минутное сочетание Val в 23	99,2
195-минутное сочетание Val в 23	99,2
255-минутное сочетание Val в 23	99,5
350-минутное сочетание Val в 23	99,5
После 60 минут повторного сочетания с дополнительным 1,5 экв.	99,6
После 221-минутного повторного сочетания с дополнительным 1,5 экв., отобранным в ходе промывки.	99,7
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с Val в 23	95,8
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с Val в 23	100,3
5 минут в ходе 4-го 50-минутного снятия защиты с Val в 23	100
Val со снятой защитой в 23 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	100
75-минутное сочетание Phe в 22	98,9
135-минутное сочетание Phe в 22	99,1
195-минутное сочетание Phe в 22	99,5
255-минутное сочетание Phe в 22	99,4
360-минутное сочетание Phe в 22	99,7
Сочетание Phe в 22 после повторного связывания в течение 120 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,8
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с Phe в 22	94,8
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с Phe в 22	99,5
5 минут в ходе 4-го 50-минутного снятия защиты с Phe в 22	100
Phe со снятой защитой в 22 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	100
75-минутное сочетание Ala в 21	78,2
135-минутное сочетание Ala в 21	96,2
195-минутное сочетание Ala в 21	99
255-минутное сочетание Ala в 21	99,5
360-минутное сочетание Ala в 21	99,8
Сочетание Ala в 21 после повторного связывания в течение 120 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,7
Сочетание Ala в 21 после повторного связывания в течение 216 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,8

Ala со снятой защитой в 21 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	100
75-минутное сочетание Lys-ivDde в 20	73
135-минутное сочетание Lys-ivDde в 20	82,4
195-минутное сочетание Lys-ivDde в 20	92
255-минутное сочетание Lys-ivDde в 20	95,1
360-минутное сочетание Lys-ivDde в 20	98
448-минутное сочетание Lys-ivDde в 20	98,3
565-минутное сочетание Lys-ivDde в 20	99,1
Сочетание Lys-ivDde в 20 через 60 мин. с дополнительными 1,5 экв.	99
Lys-ivDde со снятой защитой в 20 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	98,1
75-минутное сочетание Gln в 19	65,5
135-минутное сочетание Gln в 19	79,7
195-минутное сочетание Gln в 19	90,7
255-минутное сочетание Gln в 19	96,2
360-минутное сочетание Gln в 19	98,9
Сочетание Gln в 19 после повторного связывания в течение 60 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,4
Сочетание Gln в 19 после 180-минутного повторного сочетания с дополнительными 1,5 экв., полученными в ходе промывки	99,6
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с Gln в 19	93,8
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с Gln в 19	99,1
5 минут в ходе 4-го 50-минутного снятия защиты с Gln в 19	99,6
Gln со снятой защитой в 19 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	99,8
75-минутное сочетание Ala в 18	81,8
135-минутное сочетание Ala в 18	97,1
195-минутное сочетание Ala в 18	99,1
255-минутное сочетание Ala в 18	99,5
360-минутное сочетание Ala в 18	99,7
Сочетание Ala в 18 после 60 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,8
Сочетание Ala в 18 после 180 минут с дополнительными 1,5 экв., полученными в ходе промывки	99,9
Сочетание Ala в 18 после 180 минут с дополнительными 1,5 экв., полученными в ходе второй комбинированной промывки	99,9
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с Ala в 18	87,2
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с Ala в 18	98,5

## 048130

5 минут в ходе 4-го 50-минутного снятия защиты с Ala в 18	99,6
Ala со снятой защитой в 18 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	99,7
75-минутное сочетание Pe в 17	68,6
135-минутное сочетание Pe в 17	85,7
195-минутное сочетание Pe в 17	91,7
255-минутное сочетание Pe в 17	93,9
360-минутное сочетание Pe в 17	96,5
Сочетание Pe в 17 после повторного связывания в течение 60 минут с дополнительными 1,5 экв.	98,3
Сочетание Pe в 17 после 180-минутного повторного сочетания с дополнительными 1,5 экв., полученными в ходе промывки	99,2
Сочетание Pe в 17 после второго повторного связывания в течение 60 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,6
Сочетание Pe в 17 после второго повторного связывания в течение 600 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,5
Сочетание Pe в 17 после 180-минутного второго повторного сочетания с дополнительными 1,5 экв., полученными в ходе промывки	99,8
5 минут после первого 50-минутного снятия защиты с Pe в 17	
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с Pe в 17	90,3
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с Pe в 17	99,5
5 минут в ходе 4-го 50-минутного снятия защиты с Pe в 17	99,7
Pe со снятой защитой в 17 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	99,9
75-минутное сочетание Lys в 16	82,3
135-минутное сочетание Lys в 16	91,2
195-минутное сочетание Lys в 16	96,5
255-минутное сочетание Lys в 16	99
360-минутное сочетание Lys в 16	99,5
Сочетание Lys в 16 после повторного связывания в течение 60 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,7
Сочетание Lys в 16 после повторного связывания в течение 180 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,8
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с Lys в 16	94,4
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с Lys в 16	99,7

5 минут в ходе 4-го 50-минутного снятия защиты с Lys в 16	99,8
Lys со снятой защитой в 16 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	100
75-минутное сочетание Asp в 15	89,6
135-минутное сочетание Asp в 15	98,7
195-минутное сочетание Asp в 15	99,2
255-минутное сочетание Asp в 15	99,5
360-минутное сочетание Asp в 15	99,6
Сочетание Asp в 15 после повторного связывания в течение 120 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,7
Сочетание Asp в 15 после 360-минутного повторного сочетания с дополнительными 1,5 экв., полученными в ходе промывки	99,7
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с Asp в 15	99,2
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с Asp в 15	99,8
75-минутное сочетание Leu в 14	80
135-минутное сочетание Leu в 14	93,9
195-минутное сочетание Leu в 14	99,2
255-минутное сочетание Leu в 14	99,5
360-минутное сочетание Leu в 14	99,6
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с Leu в 14	60,1
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с Leu в 14	95,6
5 минут в ходе 4-го 50-минутного снятия защиты с Leu в 14	99,5
Leu со снятой защитой в 14 после пяти 50-минутных перемешиваний с пиперидином	99,8
75-минутное сочетание Aib в 13	66,4
135-минутное сочетание Aib в 13	79,9
195-минутное сочетание Aib в 13	88,3
255-минутное сочетание Aib в 13	89,4
360-минутное сочетание Aib в 13	94,5
474-минутное сочетание Aib в 13	96,4
Сочетание Aib в 13 после повторного связывания в течение 60 минут с дополнительными 1,5 экв.	97,9
Сочетание Aib в 13 после повторного связывания в течение 180 минут с дополнительными 1,5 экв.	98,1
Сочетание Aib в 13 после повторного связывания в течение 440 минут с дополнительными 1,5 экв.	98,6
Сочетание Aib в 13 после повторного связывания в течение 600 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,3

## 048130

Сочетание A1b в 13 после повторного связывания в течение 817 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,4
Сочетание A1b в 13 после повторного связывания в течение 1059 минут с дополнительными 1,5 экв.	99,4
5 минут в ходе 2-го 50-минутного снятия защиты с A1b в 13	97
5 минут в ходе 3-го 50-минутного снятия защиты с A1b в 13	96,9
5 минут в ходе 4-го 50-минутного снятия защиты с A1b в 13	97,9
5 минут в ходе 6-го снятия защиты (перемешивание в течение 90 минут)	99,4
5 минут в ходе 7-го снятия защиты (перемешивание в течение 90 минут)	99,2
5 минут в ходе 8-го снятия защиты (перемешивание в течение 90 минут)	99,7
A1b со снятой защитой в 13 после 8 перемешиваний с пиперидином	99,7
75-минутное сочетание Pe в 12	54,9
135-минутное сочетание Pe в 12	58,8
195-минутное сочетание Pe в 12	62,8
360-минутное сочетание Pe в 12	70,7
600-минутное сочетание Pe в 12	79,1
897-минутное сочетание Pe в 12 (60 мин. в ходе повторного сочетания)	86,7
1137-минутное сочетание Pe в 12 (5 ч. в ходе повторного сочетания)	89,9
1437-минутное сочетание Pe в 12 (10 ч. в ходе повторного сочетания)	94
1837-минутное сочетание Pe в 12 (16,7 ч. в ходе повторного сочетания)	96,7
2337-минутное сочетание Pe в 12 (25 ч. в ходе повторного сочетания)	98,1
2789-минутное сочетание Pe в 12 (32,5 ч. в ходе повторного сочетания)	99
2946-минутное сочетание Pe в 12 (15 мин. в ходе второго повторного сочетания)	99
3006-минутное сочетание Pe в 12 (75 мин. в ходе второго повторного сочетания)	99,1
3171-минутное сочетание Pe в 12 (240 мин. в ходе второго повторного сочетания)	99,1
3454-минутное сочетание Pe в 12 (523 мин. в ходе второго повторного сочетания)	99,3
5 минут в ходе 3-го 20-минутного снятия защиты с Pe 12	100,4
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Pe 12	99,6
Ближний конец 4-го снятия защиты с Pe 12.	100
75-минутное сочетание Ser11	97,2
135-минутное сочетание Ser11	99,1

## 048130

5 мин. в ходе 3-го 20-минутного снятия защиты с Ser11	100
45 мин. в ходе 4-го снятия защиты с Ser11	99,6
Окончательная проба снятия защиты, взятая в ходе промывки	99,7
75-минутное сочетание Tуг10	93,7
135-минутное сочетание Tуг10	98,3
195-минутное сочетание Tуг10	99,3
255-Минутное сочетание Tуг10	99,5
360-минутное сочетание Tуг10	100
Проба 589 мин., 60 мин. в ходе повторного сочетания Tуг10	100
Проба 648 мин., сочетание Tуг10 в конце, проба в ходе промывки	100
5 мин. в ходе 3-го 20-минутного снятия защиты с Tуг10 (76 мин.)	99,4
45 мин. в ходе 4-го снятия защиты с Tуг10 (151 мин.)	99,5
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Tуг10 (226 мин.)	99,7
4 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Tуг10 (346 мин.)	99,7
6 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Tуг10 (466 мин.)	99,7
8 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Tуг10 (586 мин.)	99,7
Снятие защиты с Tуг10, проба в ходе промывки (668 мин.)	100
15-минутное сочетание Asp 9	90,1
75-минутное сочетание Asp 9	98,1
135-минутное сочетание Asp 9	99,3
195-минутное сочетание Asp 9	99,3
255-минутное сочетание Asp 9	99,4
360-минутное сочетание Asp 9	99,6
Проба 562 мин., 60 мин. в ходе повторного сочетания Asp9	99,6
Проба 682 мин., сочетание Asp9 в конце, проба в ходе промывки	99,6
Проба 851 мин., сочетание Asp9 в конце, проба в ходе промывки	99,7
2 мин. в ходе 4-го 5-минутного снятия защиты с Asp9 (71 мин.)	100
1 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Asp9 (129 мин.)	99,6
Конец снятия защиты с Asp9, отобранных в ходе промывки (221 мин.)	99,6
75-минутное сочетание Ser8	96,3
135-минутное сочетание Ser8	97,9
195-минутное сочетание Ser8	99,7
255-Минутное сочетание Ser8	99,5
360-минутное сочетание Ser8	99,6

## 048130

Проба 562 мин.(60 мин. в ходе повторного сочетания) Ser8	99,7
Проба 682 мин.(180 мин. в ходе повторного ) Ser8	99,7
5 мин. в ходе 2-го 30-минутного снятия защиты с Ser8 (60 мин.)	99,9
5 мин. в ходе 3-го 30-минутного снятия защиты с Ser8 (105 мин.)	99,7
5 мин. в ходе 4-го 30-минутного снятия защиты с Ser8 (149 мин.)	99,8
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Ser8 (264 мин.)	99,8
4 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Ser8 (384 мин.)	99,9
Конец снятие защиты с Ser8, проба в ходе промывки (668 мин.)	99,9
75-минутное сочетание Thr7	99,7
135-минутное сочетание Thr7	99,5
195-минутное сочетание Thr7	99,7
5 мин. в ходе 2-го 30-минутного снятия защиты с Thr7 (65 мин.)	98,7
5 мин. в ходе 3-го 30-минутного снятия защиты с Thr7 (115 мин.)	99,7
5 мин. в ходе 4-го 30-минутного снятия защиты с Thr7 (164 мин.)	100
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Thr7 (279 мин.)	100
Окончательное снятие защиты с Thr7 в ходе промывки (453 мин.)	100
75-минутное сочетание Phe6	96,7
135-минутное сочетание Phe6	97,6
195-минутное сочетание Phe6	99,1
255-Минутное сочетание Phe6	99,5
360-минутное сочетание Phe6	99,3
485-минутное сочетание Phe6	99,5
605-минутное сочетание Phe6	99,2
725-минутное сочетание Phe6	99,5
845-минутное сочетание Phe6	99,5
903-минутное сочетание Phe6, проба в ходе промывки	99,5
5 мин. в ходе 3-го 30-минутного снятия защиты с Phe6 (81 мин.)	98,7
25 мин. в ходе 4-го 30-минутного снятия защиты с Phe6 (136 мин.)	99,6
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Phe6 (230 мин.)	99,6
4 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Phe6 (350 мин.)	99,5
Окончательное снятие защиты с Phe6 в ходе промывки (441 мин.)	99,5
75-минутное сочетание Thr5	99,3
135-минутное сочетание Thr5	98,5
195-минутное сочетание Thr5	99,3

## 048130

255-Минутное сочетание Thr5	99,5
360-минутное сочетание Thr5	99,5
486-минутное сочетание Thr5	99,5
606-минутное сочетание Thr5	99,6
726-минутное сочетание Thr5	99,7
783-минутное сочетание Thr5, в ходе промывки	99,7
5 мин. в ходе 3-го 30-минутного снятия защиты с Thr5 (81 мин.)	99,9
25 мин. в ходе 4-го 30-минутного снятия защиты с Thr5 (136 мин.)	99,2
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Thr5 (230 мин.)	99,5
4 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Thr5 (350 мин.)	99,8
Окончательное снятие защиты с Thr5 в ходе промывки (804 мин.)	100
195-минутное сочетание Gly4	99,2
255-Минутное сочетание Gly4	99,1
360-минутное сочетание Gly4	99,3
486-минутное сочетание Gly4	99,4
606-минутное сочетание Gly4	99,5
726-минутное сочетание Gly4	99,4
846-минутное сочетание Gly4	99,4
966-минутное сочетание Gly4	99,4
1238-минутное сочетание Gly4	99,4
1358-минутное сочетание Gly4	99,6
1478-минутное сочетание Gly4	99,5
1598-минутное сочетание Gly4	99,6
1749-минутное сочетание Gly4	99,6
5 мин. в ходе 3-го 30-минутного снятия защиты с Gly4 (81 мин.)	99,7
25 мин. в ходе 4-го 30-минутного снятия защиты с Gly4 (136 мин.)	100
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Gly4 (230 мин.)	100
4 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Gly4 (350 мин.)	100
6 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Gly4 (466 мин.)	100
Окончательное снятие защиты с Gly4 в ходе промывки (588 мин.)	100
75-минутное сочетание Glu3	94,6
135-минутное сочетание Glu3	98,6
195-минутное сочетание Glu3	98,6
255-Минутное сочетание Glu3	99,1
360-минутное сочетание Glu3	99
486-минутное сочетание Glu3	99,3
606-минутное сочетание Glu3	99
726-минутное сочетание Glu3	99,2
846-минутное сочетание Glu3	99,2

965-минутное сочетание Glu3	99,4
1304-минутное сочетание Glu3	99,4
5 мин. в ходе 3-го 30-минутного снятия защиты с Glu3 (81 мин.)	99,8
25 мин. в ходе 4-го 30-минутного снятия защиты с Glu3 (136 мин.)	99,4
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Glu3 (230 мин.)	100
4 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Glu3 (350 мин.)	100
75-минутное сочетание Aib2	95
135-минутное сочетание Aib2	99,4
195-минутное сочетание Aib2	99,6
255-Минутное сочетание Aib2	99,7
360-минутное сочетание Aib2	99,7
5 мин. в ходе 3-го 30-минутного снятия защиты с Aib2 (81 мин.)	100
25 мин. в ходе 4-го 30-минутного снятия защиты с Aib2 (136 мин.)	99,6
2 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Aib2 (230 мин.)	100
4 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Aib2 (350 мин.)	100
6 ч. в ходе 4-го снятия защиты с Aib2 (470 мин.)	100
Снятие защиты с Aib2, проба в ходе промывки (559 мин.)	100
75-минутное сочетание Вос-Тур1	86,8
135-минутное сочетание Вос-Тур1	94,8
195-минутное сочетание Вос-Тур1	98
255-минутное сочетание Вос-Тур1	99,4
360-минутное сочетание Вос-Тур1	99,6
485-минутное сочетание Вос-Тур1	100

В ходе синтеза 39-мерного пептида было внесено несколько усовершенствований в систему автоматического отбора онлайн-ЖХ-МС вследствие проблем с засорением и переносом твердых частиц. От Pro37 до Ser33 отбор проб осуществляют с использованием перистальтического насоса, расположенного между реактором и 3-ходовыми клапанами отбора проб. Тем не менее, насос измельчает смолу, образуя мелкие твердые частицы, что приводит к низкой скорости фильтрации при извлечении жидкости из RB3. Время прокачки пробы смолы сокращается, и насос перемещается после трехходовых клапанов, так что смола фактически не попадает в насос. В ходе сочетания Ala21 и всех последующих соединений система модифицируется для установки возможности промывки 2 автоматических 3-ходовых клапанов для проб суспензии растворителем DMF после каждой пробы. Для предотвращения засорения трехходовых пробоотборных клапанов твердыми частицами, которые не вымываются обратно в реакторы в конце каждой последовательности, DMF пропускают через пробоотборные клапаны в смесительный бак для снятия защиты, а затем через клапан 518k в отходы (фиг. 4).

Через определенные промежутки времени в ходе синтеза образцы смолы отбирают для анализа, как описано выше, а также отбирают образцы для дальнейшего изучения в автономном режиме. Оставшееся количество смолы в каждом реакторе, выраженное в ммоль на основе массового баланса, указано в табл. 4. Соответственно, количества материалов, загружаемых в систему для снятия защиты, промывки DMF после снятия защиты, связывания аминокислот и промывки DMF после связывания, регулируют по количеству смолы, которая остается на каждой стадии. Следует отметить, что в производственном цикле маловероятно, что большие пробы будут отобраны для автономного анализа, и количество ммоль основы смолы не изменится резко.

Таблица 4

Ммоль смолы в каждом реакторе на протяжении всего синтеза  
39-мерного пептида после удаления проб, рассчитанный по массовым балансам

Положение AA	Смола, оставшая ся в RB1 по массовым балансам (ммоль)	Смола, оставшая ся в RB2 по массовым балансам (ммоль)	Смола, оставшая ся в RB3 по массовым балансам (ммоль)
Ser39	117	117	117
Pro38	117	117	116,7
Pro37	117	117	115,8
Pro36	117	117	115,3
Ala35	117	117	114,4
Gly34	117	117	114
Ser33	117	117	113,4
Ser32	108,6	108,6	108,3
Pro31	108,6	108,6	106,9
Gly30	108,6	108,6	106,3
Gly29	107,1	107	104
Ala28	107,1	107	103,4
Ile27	105,4	105,3	101,1
Leu26	105,2	105,3	100,5
Trp25	105,2	105,3	99,85
Gln24	105,2	105,3	99,25
Val23	105,2	104,9	98,91
Phe 22	105,2	104,9	98,26
Ala21	100,1	98,48	97,45
Lys- ivDde20	97,33	96,34	96,7
Gln19	97,33	91,9	94,29
Ala18	97,33	91,58	93,66
Ile17	50,98	49,1	51,08
Lys16	50,98	48,96	50,28
Asp15	50,98	48,8	49,84
Leu14	46,48	44,07	49,01
Aib13	46,48	43,89	48,37
Ile12	42,02	43,89	47,72
Ser11	42,02	43,89	46,45
Tyr10	42,02	43,89	45,96
Asp9	42,02	40,09	45,31
Ser8	38,44	40,09	44,83
Thr7	38,44	40,09	44,3
Phe6	38,44	40,01	43,7
Thr5	38,44	36,23	43,12
Gly4	38,44	36,23	39,78
Glu3	35,72	36,23	38,94
Aib2	35,62	36,23	34,56
Boc-Tyr1	35,62	36,23	33,98

Массы растворов аминокислот и соединительных реагентов, использованных на стадиях сочетания аминокислот, приведены в табл. 5.

Таблица 5

Массы растворов аминокислот и реагентов для сочетания,  
используемых на стадиях сочетания аминокислот

Положение AA	Масса AA в RB1 (раствор 0,375 М), г	Масса Охута в RB1 (раствор 0,68 М, плотность 0,985), г	Масса DIC в BB1 (раствор 0,6 М, плотность 0,946), г	Масса AA в RB2 (раствор 0,375 М), г	Масса Охута в RB2 (раствор 0,6 М, плотность 0,985), г	Масса DIC в BB2 (раствор 0,6 М, плотность 0,946), г	Масса AA в RB3 (раствор 0,375 М), г	Масса Охута в RB3 (раствор 0,68 М, плотность 0,985), г	Масса DIC в RB3 (раствор 0,6 М, плотность 0,946), г
Ser в 39	764	442	521	764	407	511	773	406	510
Pro в 38	460	249	308	457	242	310	459	244	311
Повторное сочетание Pro в 38	153	88	101	153	84	106	154	87	104
Pro в 37	476	253	305	476	253	304	464	253	505
Pro в 36	458	257	304	458	257	304	457	255	304
Повторное сочетание Pro в 36	306	165	200	305	167	202	305	166	202
Ala в 35		250	300	467	252	303	447	251	304
Повторное сочетание Ala в 35	296	167	201	298	169	203	296	168	202
Gly в 34	454	256	306	448	253	305	458	251	306
Повторное сочетание Gly в 34	308	166	204	305	166	204	307	167	203
Ser в 33	466	254	302	468	253	303	467	252	301
Ser в 32	427	228	277	428	231	278	427	231	278
Повторное сочетание Ser в 32	142	76	93	143	76	93	143	75	92
Pro в 31	422	228	275	421	229	276	420	229	279
Повторное сочетание Pro в 31	281	155	186	281	155	186	280	153	185
Gly в 30	411	230	280	412	229	279	418	228	279
Повторное сочетание Gly в 30	281	153	185	279	154	188	281	153	187
Gly в 29	414	226	270	416	227	270	416	228	271
Повторное сочетание Gly в 29	277	153	185	276	152	183	275	150	183
Ala в 28	423	225	269	426	226	270	420	227	270
Повторное сочетание Ala в 28	283	150	181	286	150	183	280	151	183
Ile в 27		222	268	391	224	268	399	221	
Повторное сочетание Ile в 27	270	147	183	270	151	181	270	151	182
Leu в 26	403	221	268	403	224	268	403	222	267
Повторное сочетание Leu в 26	273	148	180	272	149	180	273	149	180
Trp в 25	420	224	266	422	222	267	421	223	269
Gln в 24	411	228	265	418	230	268	419	229	268
Повторное сочетание Gln в 24	415	227	264	418	228	266	417	227	266
Val в 23	500	225	269	419	225	267	449	229	267
Повторное сочетание Val в 23	399	226	268	408	226	269	394	227	267
Phe в 22	466	222	264	340	226	266	364	227	267
Повторное сочетание Phe в 22	424	224	268	405	226	272	382	228	270
Ala в 21	385	218	262	387	217	259	389	218	259

## 048130

Повторное сочетание Ala в 21	363	219	260	389	219	258	415	218	258
Lys-ivDde в 20	384	214	258	401	214	257	386	214	257
Повторное сочетание Lys-ivDde в 20	374	216	255	389	215	255	392	216	255
Gln в 19	373	205	240	376	204	242	378	205	243
Повторное сочетание Gln в 19	375	208	240	377	204	241	377	204	242
Ala в 18	367	204	241	373	208	243	399	204	243
Повторное сочетание Ala в 18	352	205	242	370	202	242	379	206	243
Ile в 17	179	102	124	184	103	118	183	104	125
Повторное сочетание Ile в 17	183	106	122	184	101	122	185	104	124
Второе повторное сочетание Ile в 17	184	101	121	184	102	122	184	101	121
Lys в 16	188	105	131	201	108	131	195	113	131
Повторное сочетание Lys в 16	194	109	132	191	109	132	191	111	131
Asp в 15	197	108	131	199	109	131	199	110	131
Повторное сочетание Asp в 15	199	110	130	200	109	132	199	109	131
Leu в 14	189	109	129	190	108	130	191	109	131
Aib в 13	190	103	130	188	108	130	187	110	130
Повторное сочетание Aib в 13	187	109	127	182	107	123	183	109	127
Ile в 12	184	111	128	183	111	128	183	111	126
Повторное сочетание Ile в 12	193	110	126	193	110	124	194	112	127
Второе повторное сочетание Ile в 12	193	109	123	193	112	125	194	110	141
Ser в 11	197	111	131	199	111	131	199	111	129
Повторное сочетание Ser в 11	201	108	127	201	109	127	200	108	127
Tyr 10	186	109	128	196	111	130	197	111	125
Повторное сочетание Tyr 10	198	111	130	197	105	115	196	111	130
Asp в 9	197	106	127	197	108	129	197	109	130
Повторное сочетание Asp в 9	197	107	127	197	110	127	198	108	128
Ser в 8	198	109	126	199	109	128	199	106	132
Повторное сочетание Ser в 8	198	108	127	199	109	129	199	108	131
Thr в 7	187	105	125	192	106	126	192	106	127
Phe в 6									
Thr в 5	178	94	116	181	101	116	180	101	117
Gly в 4	159	91	104	160	90	105	160	90	104
Повторное сочетание Gly в 4	162	90	102	161	90	103	160	91	103
Glu в 3	157	90	102	157	91	103	157	90	105
Повторное сочетание Glu в 3	156	89	102	156	92	103	156	88	104
Aib в 2	147	91	105	158	92	103	158	88	104
Вос-Тур в 1	148	88	103	159	91	103	159	90	107

Концентрация пиперидина, измеренная посредством ГХ в некоторых промывках DMF после снятия

защиты посредством пиперидина, показана в табл. 6.

Таблица 6  
Концентрация пиперидина, измеренная посредством ГХ в пробах промывки DMF после снятия защиты посредством пиперидина

АА, с которой снимается защита	Номер промывки	Концентрация пиперидина, измеренная посредством ГХ (ppm)
Pro37	1	92934
Pro37	2	48686
Pro37	3	20466
Pro37	4	9359
Pro37	5	3430
Pro37	6	1511
Pro37	7	584
Pro37	8	210
Pro36	8	293
Ser33	9	416
Ser32	9	405
Gly30	10	303
Gly29	10	314
Ala28	10	314
Trp25	1	79261
Trp25	2	47881
Trp25	3	28632
Trp25	4	30848
Trp25	5	13531
Trp25	6	873
Trp25	7	5600
Trp25	8	3051
Trp25	9	1552
Trp25	10	715
Trp25	11	118
Gln24	1	Нет данных
Gln24	2	78207
Gln24	3	51279
Gln24	4	40019
Gln24	5	17834
Gln24	6	10398
Gln24	7	4117
Gln24	8	2607
Gln24	9	1104
Gln24	10	530
Gln24	11	251
Val23	1	91976
Val23	2	67926
Val23	3	44561
Val23	4	26703
Val23	5	12570
Val23	6	5879
Val23	7	2901
Val23	8	1359
Val23	9	639,8
Val23	10	248,8
Val23	11	173,2
Phe22	1	76446
Phe22	2	74814,6
Phe22	3	26287,3
Phe22	4	24601,2
Phe22	5	8974
Phe22	6	4339,3
Phe22	7	1890,2
Phe22	8	1151,8

048130

Phe22	9	392,79
Phe22	10	98,56
Phe22	11	172
Lys-ivDde20	1	42643
Lys-ivDde20	2	44257,4
Lys-ivDde20	3	25899,6
Lys-ivDde20	4	21715,9
Lys-ivDde20	5	8076,5
Lys-ivDde20	6	3272,5
Lys-ivDde20	7	1805,4
Lys-ivDde20	8	1416,9
Lys-ivDde20	9	345,7
Lys-ivDde20	10	187,2
Lys-ivDde20	11	48
Ile17	11	BQL*
Lys16	10	BQL*
Leu14	1	70943
Leu14	2	46640
Leu14	3	29161
Leu14	4	11809
Leu14	5	6028
Leu14	6	3130
Leu14	7	1514
Leu14	8	693
Leu14	9	355
Leu14	10	170
Leu14	11	89
Aib13	1	73216
Aib13	2	46359
Aib13	3	25310
Aib13	4	9889
Aib13	5	4531
Aib13	6	2035
Aib13	7	855
Aib13	8	339
Aib13	9	141
Aib13	10	65
Aib13	11	32
Ile12	1	47929
Ile12	1	47624
Ile12	1	47547
Ile12	1	47997
Ile12	2	45752
Ile12	3	27704

## 048130

Ile12	4	14982
Ile12	5	7596
Ile12	6	3726
Ile12	7	1785
Ile12	8	881
Ile12	9	416
Ile12	10	226
Ile12	11	130
Ile12	12	77
Ser11	1	68399
Ser11	2	56189
Ser11	3	34710
Ser11	4	17972
Ser11	5	8946
Ser11	6	4422
Ser11	7	2116
Ser11	8	1079
Ser11	9	571
Ser11	10	341
Ser11	11	220
Ser11	12	150
Tyr10	1	82614
Tyr10	2	70849
Tyr10	3	52591
Tyr10	4	33232
Tyr10	5	20875
Tyr10	6	12343
Tyr10	7	7197
Tyr10	8	4270
Tyr10	9	2315
Tyr10	10	1349
Tyr10	11	822
Tyr10	12	529
Asp9	1	89611
Asp9	2	66987
Asp9	3	48125
Asp9	4	31863
Asp9	5	19910
Asp9	6	12544
Asp9	7	7585
Asp9	8	Нет данных
Asp9	9	Нет данных
Asp9	10	Нет данных
Asp9	11	1079

## 048130

Asp9	12	628
Ser8	1	71900
Ser8	2	67376
Ser8	3	43750
Ser8	4	30884
Ser8	5	19589
Ser8	6	11802
Ser8	7	Нет данных
Ser8	8	Нет данных
Ser8	9	Нет данных
Ser8	10	Нет данных
Ser8	11	Нет данных
Ser8	12	Нет данных
Thr7	12	417
Phe6	0	144053
Phe6	1	91619
Phe6	2	70218
Phe6	3	48031
Phe6	4	29556
Phe6	5	18298
Phe6	6	10522
Phe6	7	6101
Phe6	8	3600
Phe6	9	1908
Phe6	10	1087
Phe6	11	665
Phe6	12	406
Thr5	1	84672
Thr5	2	64401
Thr5	3	42721
Thr5	4	26810
Thr5	5	15413
Thr5	8	237
Thr5	8	245
Thr5	8	241
Thr5	6	9225
Thr5	7	5301
Thr5	8	3008
Thr5	9	1628
Thr5	10	898
Thr5	11	534
Thr5	12	302
Gly4	1	74341
Gly4	2	53045

Gly4	3	39664
Gly4	4	23499
Gly4	5	12191
Gly4	6	8351
Gly4	7	4645
Gly4	8	2426
Gly4	9	1253
Gly4	10	741
Gly4	11	459
Gly4	12	269
Glu3	1	81614
Glu3	2	62388
Glu3	3	40864
Glu3	4	24403
Glu3	5	13902
Glu3	6	7720
Glu3	7	4301
Glu3	8	2244
Glu3	9	1124
Glu3	10	602
Glu3	11	347
Glu3	12	187
Aib2	1	74997
Aib2	2	59347
Aib2	3	42527
Aib2	4	25732
Aib2	5	14293
Aib2	6	8446
Aib2	7	4789
Aib2	8	2650
Aib2	9	1321
Aib2	10	721
Aib2	11	427
Aib2	12	216

\* BQL - ниже предела количественного определения.

Количество и масса промывок раствором пиперидина и DMF, использованных для снятия защиты в ходе синтеза промежуточного соединения с 39-мерной основной цепью (фиг. 7), показаны в табл. 7. Также в табл. 7 приведен расчет массы данных растворов (г), использованных в расчете на ммоль смолы (определяется посредством деления массы на ммоль смолы, присутствующей на каждой стадии, как указано в табл. 4).

Таблица 7

Количество промывок и масса реагента/растворителя, использованная в расчет на ммоль смолы для всех снятий защиты в ходе синтеза промежуточного соединения с 39-мерной основной цепью

Положение AA	Количество промывок 20 об.% раствором пиперидина для снятия	Общая масса промывочных растворов 20 об.% пиперидина для снятия защиты (г)	Общая масса промывочных растворов 20 об.% пиперидина (г)/ммоль смолы	Количество промывок DMF после снятия защиты	Общая масса промывок DMF после снятия защиты (г)	Общая масса промывок DMF после снятия защиты (г)/ммоль смолы
Ser39	3	4040	11,51	8	11950	34,05
Pro38	3	4030	11,49	8	11580	33,02
Pro37	4	5430	15,52	11	15720	44,94
Pro36	8	11030	31,58	16	23590	67,54
Ala35	4	5480	15,73	8	11730	33,67
Gly34	6	8250	23,71	16	23540	67,64
Ser33	6	8410	24,21	11	15830	45,57
Ser32	6	8410	25,84	9	12400	38,1
Pro31	6	7750	23,91	9	12380	38,2
Gly30	8	10430	32,24	10	13830	42,75
Gly29	6	7620	23,95	10	13520	42,5
Ala28	8	9720	30,61	10	13580	42,77
Ile27	8	9560	30,66	11	13440	43,1
Leu26	8	9720	31,25	11	13510	43,44
Trp25	8	9690	31,22	11	13460	43,37
Gln24	6	7220	23,31	11	13540	43,71
Val23	5	6030	19,51	11	13440	43,49
Phe22	5	6100	19,78	11	13410	43,49
Ala21	5	6130	20,71	11	13650	46,11
Lys-ivDde20	5	6100	21,01	11	13790	47,49
Gln19	5	5460	19,26	11	12330	43,49
Ala18	5	5390	19,07	11	13570	48,02
Ile17	5	2640	17,46	11	7050	46,64
Lys16	5	2400	15,98	11	6950	46,27
Asp15	5	2420	16,17	11	7090	47,39
Leu14	5	2510	17,99	11	7060	50,59
Aib13	5	2490	17,95	11	10200	73,52
Ile12	8	3830	28,66	12	11050	82,69
Ser11	6	3020	22,82	12	11000	83,11
Tyr10	6	3040	23,05	12	7390	56,04
Asp9	6	3050	23,94	12	6920	54,31
Ser8	6	3010	24,4	12	7450	60,39
Thr7	6	3010	24,51	12	7690	62,61
Phe6	6	3030	24,81	12	7550	61,81
Thr5	6	2970	25,21	12	7530	63,93
Gly4	6	3010	26,3	12	7540	65,88
Glu3	6	2990	26,96	12	7840	70,7
Aib2	6	3010	28,29	12	7600	71,42
Woc-Tyr1	6	3000	28,35	12	7600	71,81

Масса реагентов для сочетания (г), использованных в расчете на ммоль смолы, количество промывок DMF после сочетания аминокислот и масса DMF (г), использованная в данных промывках в расчете на ммоль смолы в течение всего синтеза промежуточного соединения с 39-мерной основной цепью (фиг. 7), показаны в таблице 8. Как и в табл. 7, массу материалов (г), использованных в расчете на ммоль смолы в табл. 8, определяют посредством деления массы на ммоль смолы, присутствующей на каждой стадии, как указано в табл. 4.

Таблица 8

Количество промывок и масса реагента/растворителя, использованная на ммоль смолы для всех сочетаний аминокислот в ходе синтеза 39-мерного промежуточного соединения основной цепи

Положение AA	Общая масса раствора AA, используемого для сочетания (г)/ммоль смолы	Общая масса растворов Охута, использованных для сочетания (г)/ммоль смолы	Общая масса раствора DIC, используемого для сочетания (г)/ммоль смолы	Количество промывок DMF после сочетания AA	Общая масса промывок DMF после сочетания (г)/ммоль смолы
Ser39	6,56	3,58	4,39	7	28,75
Pro38	5,24	2,83	3,54	8	33,13
Pro37	4,05	2,17	3,18	8	33,59
Pro36	6,55	3,63	4,34	7	29,12
Ala35	6,5	3,61	4,34	8	33,67
Gly34	6,55	3,62	4,39	8	33,79
Ser33	4,03	2,18	2,61	7	29,27
Ser32	5,25	2,82	3,41	9	38,96
Pro31	6,49	3,55	4,28	10	43,1
Gly30	6,44	3,55	4,32	10	43,28
Gly29	6,52	3,57	4,28	10	42,66
Ala28	6,67	3,56	4,27	10	43,37
Ile27	6,42	3,58	4,33	11	43,14
Leu26	6,52	3,58	4,32	11	43,38
Trp25	4,07	2,16	2,58	11	43,4
Gln24	8,06	4,42	5,16	11	43,26
Val23	8,31	4,39	5,2	11	43,75
Phe22	7,72	4,39	5,21	11	44,1
Ala21	7,86	4,42	5,26	11	46,48
Lys-ivDde20	8,01	4,44	5,29	11	47,32
Gln19	7,96	4,34	5,11	11	48,6
Ala18	7,93	4,35	5,15	11	66,85
Ile17	10,92	6,11	7,27	11	44,32
Lys16	7,72	4,36	5,25	11	47,2
Asp15	7,97	4,38	5,25	11	47,45
Leu14	4,08	2,34	2,79	11	50,73
Aib13	8,05	4,66	5,53	11	64,08
Ile12	12,8	7,45	8,59	12	85,01
Ser11	9,04	4,97	5,83	12	84,32
Tyr10	8,87	4,99	5,75	10	47,24
Asp9	9,28	5,09	6,03	10	43,01
Ser8	9,66	5,26	6,27	10	53,26
Thr7	4,65	2,58	3,08	10	53,24
Phe6	4,69	2,55	3,07	10	53,79
Thr5	4,58	2,51	2,96	10	55,52
Gly4	8,41	4,74	5,43	10	57,14
Glu3	8,47	4,87	5,58	10	59,07
Aib2	4,35	2,55	2,93	10	61,55
Boc-Tyr1	4,4	2,54	2,96	10	61,42

В табл. 9 показана общая сумма материалов, загруженных в реакционные сосуды в ходе синтеза промежуточного соединения с основной цепью из 39 аминокислот (фиг. 7). Табл. 9 включает суммарные данные по снятию защиты пиперидином/DMF и последующим промывкам DMF, стадиям связывания аминокислот и последующим промывкам DMF, а также смоле Зибера.

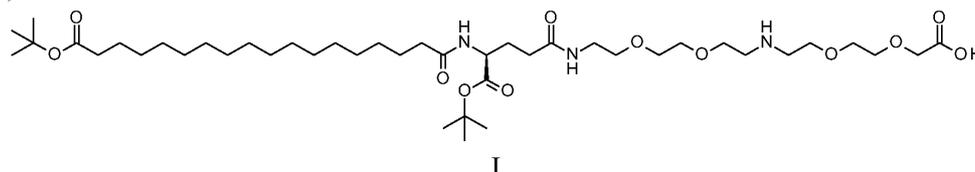
Таблица 9  
Суммарная масса материала/ммоль смолы

Стадии способа	Суммарная масса материалов, использованных в расчете на ммоль смолы (г/ммоль)
Раствор пиперидина/DMF, используемый на стадиях снятия защиты	898,93
DMF, используемый в промывках после снятия защиты с пиперидина.	2045,57
Растворы аминокислоты, Охута и DIC, используемые на стадиях сочетания	601,87
DMF, используемый в промывках после сочетаний аминокислот	1871,32
Смола Зибера	1,43
Суммарная общая масса использованных материалов/ммоль смолы (г/ммоль)	5419,12

После сочетания Вос-Туг1 связанный со смолой пептид удаляют из всех 3 реакторов, снимают нагрузку посредством промывания метиленхлоридом и сушат. Остальные стадии выполняют вручную в реакторах периодического действия, а не в автоматических последовательных реакторах. В производственном цикле смола не должна удаляться из реакторов на этой стадии, и следующие стадии будут выполняться в реакторах последовательно. Это позволит уменьшить количество необходимых реагентов и растворителей.

Для удаления защитной группы -ivDde из Lys20 соединяют гидрат гидразина (5,34 г, 68,3 ммоль) и DMF (165 г) в 2-литровом реакторе с фильтром с оболочкой в атмосфере азота, а затем добавляют высушенную смолу (50,0 г, 7,24 ммоль). Перемешивают при 20°C в течение 6 ч, затем промывают смолу с использованием DMF (5×500 мл; рекомендуется, чтобы объем промывки составлял ~100 мл) с 5-минутным перемешиванием для каждой промывки.

Для сочетания жирной кислоты/линкера готовят активированный эфир, загрузив в круглодонную колбу на 250 мл кислоту формулы I (3,6,12,15-тетраокса-9,18-дiazатрикозандиовую кислоту, 22-[[20-(1,1-димилэтокси)-1,20-диоксоэйкозил]амино]-10,19-диоксо-2,3-(1,1-димилэтил)эфир, (22S), 9,5 г, 11 ммоль), бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония гексафторфосфат (PYBOP; 5,7 г, 11 ммоль) и DMF (50 г).



Смесь перемешивают в течение 20 мин до растворения, а затем добавляют 2,4,6-триметилпиридин (1,29 г, 10,6 ммоль). Смесь активированного эфира перемешивают при температуре от 13,5 до 15,8°C в течение 20 мин, а затем добавляют ее к смоле в фильтрующем реакторе с оболочкой реактора при 25°C, используя дополнительные 5 мл DMF для промывки и переноса из колбы. Взвесь перемешивают в течение 29 ч, затем сливают воду и промывают смолу с использованием DMF (4×300 мл; объема промывки ~100 мл должно быть достаточно) с перемешиванием в течение 5 мин для каждой промывки. К реакционной смеси добавляют еще одну партию активированного эфира, полученного в соответствии с описанием ранее, и перемешивают при 25°C в течение 19 ч. Смолу сливают и промывают с использованием DMF (4×300 мл; объема промывки ~100 мл должно быть достаточно) и метиленхлоридом (4×300 мл; объема промывки ~100 мл должно быть достаточно) с 4-минутным перемешиванием для каждой промывки. Установлено, что использованная партия PYBOP была неоптимального качества, поэтому следует добавить еще одну партию активированного эфира (приготовленную на одну треть реакционной шкалы, как раньше, в 50 г DMF, используя новую бутылку PYBOP) к реакционной смеси и перемешивать при 25°C в течение 18 ч. Смолу сливают и промывают с использованием DMF (4×300 мл; объема промывки ~100 мл должно быть достаточно) и изопропанолом (4×300 мл; объема промывки ~100 мл должно быть достаточно) с 5-минутным перемешиванием для каждой промывки. В производственном цикле PYBOP должен быть высокого качества, и только один заряд активированного эфира должен быть использован для соединения промежуточного продукта формулы I. Смолу следует высушить in-vacuo при 40°C в течение ночи.

Готовят коктейль для расщепления следующим образом: объединяют дитиотреитол (DTT; 12,33 г,

79,93 ммоль) и воду (17,63 г) в круглодонной колбе объемом 5 л. В стеклянный баллон под давлением загружают TFA (538 г, 4720 ммоль) и инертизируют его 4 циклами продувки азотом под давлением 5-10 фунтов на кв. дюйм. Добавляют 60 г инертизированной TFA в круглодонную колбу на 5 л порциями по 20 г с интервалом в 2 мин, затем добавляют оставшуюся TFA в круглодонную колбу на 5 л в течение 2 мин. Добавляют триизопротилсилан (9,37 г, 59,2 ммоль) и метиленхлорид (51 г) в круглодонную колбу на 5 л и охлаждают смесь до 15°C.

Для отделения пептида от смолы и снятия защиты загружают высушенную смолу в реактор с фильтром и промойте метиленхлоридом. Добавляют коктейль для отщепления к смоле в реакторе с фильтром и перемешивают в течение 4,5 ч. Сливают реакционный раствор со смолы и добавляют его в 5-литровую круглодонную колбу, в которой готовили коктейль для отщепления. К смоле добавляют 206 г метиленхлорида, перемешивают в течение 5 мин, сливают раствор и переливают в круглодонную колбу на 5 л. Полученную смесь перемешивают и охлаждают при температуре оболочки -15°C. В течение 1,5 ч добавляют MTBE (754 г), инертизированный посредством барботирования азотом в течение 15 мин с последующим выдерживанием при медленной продувке азотом. Суспензию нагревают до -8°C и перемешивают в течение 1 ч, затем нагревают до 0°C и перемешивают в течение 1 ч. Суспензию фильтруют в атмосфере азота, не допуская полного высыхания, затем промывают твердое вещество с использованием MTBE (2×155 г) и сушат *in-vacuo* с получением неочищенного тирзепатида (38,7 г) с эффективностью 40,9%, как определено посредством ВЭЖХ. В процессе снятия защиты -ivDde, сочетания с кислотой формулы I и отщепления от смолы из смеси отбирают пробы, содержащие в общей сложности 0,34 ммоль исходной смолы. С учетом этого и эффективности ВЭЖХ выход неочищенного тирзепатида в данном процессе составляет 48%.

Способ с периодическим процессом.

Для сравнения описан периодический процесс производства тирзепатида. В реактор загружали Fmoc-смолу Зибера (17 кг, 0,76 ммоль/г). Смоле давали набухнуть в DMF, перемешивали в течение 2 ч, затем DMF отфильтровывали от смолы. Затем смолу промывали DMF, в общей сложности два раза. Затем с защищенной Fmoc смолы снимали защиту посредством обработки 20% PIP/NMP. Отбор проб для проверки удаления Fmoc проводят после последней обработки PIP/NMP для подтверждения удаления более 99% Fmoc посредством УФ-анализа. После окончательной обработки 20% мас./мас. PIP/NMP слой смолы несколько раз промывали с использованием DMF. Затем собирали основную цепь пептида с использованием следующих общих условий для сочетания и снятия защиты каждой аминокислоты:

Стадия способа	Растворитель/Реагент	Объем	Эквивалентность
Снятие Fmoc-защиты	20% (об./об.) пиперидина/NMP	9 мл/г смолы	
Промывки после снятия защиты	DMF	9 мл/г смолы	
Раствор для реакции сочетания	NMP	7,25 мл/г смолы	
	Аминокислота		3,0 экв.
	Охума Pure		3,0 экв.
	DIC		3,3 экв.
Промывки после сочетания	DMF	9 мл/г смолы	
Удаление ivDde	8% гидразин/DMF	9 мл/г смолы	
Промывки после удаления ivDde	DMF	9 мл/г смолы	
Промывки для устранения набухания после конструкции	IPA	1,8 мл/г смолы	

Снятие Fmoc-защиты.

Смолу в пептидном реакторе обрабатывают либо тремя, либо четырьмя загрузками 20% об./об. раствора PIP/NMP. Каждую обработку осуществляли с перемешиванием на смоле в течение 30 мин с последующей фильтрацией для завершения удаления защитной группы Fmoc. После заключительной обработки 20% об./об. PIP/NMP слой смолы промывали DMF не менее шести раз, используя предварительно заданный объем загрузки DMF.

Активация аминокислот.

В реактор загружают предварительно приготовленный раствор 12 мас.% Охума Pure/NMP. Затем добавляли выбранную Fmoc-аминокислоту. Смесь перемешивают при 20±5°C до полного растворения Fmoc-аминокислоты. Затем растворы Fmoc-AA/Охума Pure/NMP охлаждают до 15±3°C перед активацией для обеспечения контроля незначительной экзотермической реакции активации и поддержания температуры получаемого раствора в указанном диапазоне 20±5°C. Затем раствор аминокислоты активируют посредством добавления DIC. Затем раствор активированного сложного эфира перемешивали в течение 20-30 мин перед переносом раствора в реактор, содержащий промежуточный продукт пептида на смоле.

Сочетание.

После завершения стадии предварительной активации раствор активированного сложного эфира

переносят в реактор, содержащий пептид со снятой защитой на смоле для инициации реакции сочетания. Реакцию пептидного сочетания осуществляли при перемешивании при  $20\pm 5^\circ\text{C}$  в течение по меньшей мере 4 ч. После необходимого времени перемешивания отбирали образцы суспензии смолы для анализа на завершение сочетания (IPC). Отбор образцов повторяют с определенными интервалами по мере необходимости до получения удовлетворительного результата IPC. При необходимости проводили операции повторного сочетания. Когда связывание завершено, содержимое раствора пептидного реактора фильтруют, затем промежуточные соединения пептида на смоле несколько раз промывают DMF для подготовки к следующему сочетанию.

Сочетание Ile (12) с Aib (13).

Сочетание Fmoc-Ile(12) с Aib (13) осуществляют с использованием симметричного ангидридного подхода с использованием шести эквивалентов Fmoc-AA, трех эквивалентов DIC. Время активации для данной последовательности было увеличено до 40-60 мин. Для обеспечения образования активированных форм симметричного ангидрида. Увеличенное время перемешивания при сочетании (18 ч) необходимо для достижения завершения реакции (менее 1% несвязанного вещества) по результатам ВЭЖХ-анализа.

Краткое изложение материалов, использованных в синтезе промежуточного соединения с основной цепью из 39 аминокислот (фиг. 7).

В среднем в ходе цикла используется 3,15 порций пиперидина на 9 мл/г смолы с плотностью 0,93 г/мл, что в среднем составляет 26,4 г/г смолы. В среднем после снятия защиты проводят 7,2 промывки DMF на 9 мл/г смолы с плотностью 0,945 г/мл, в среднем 61,2 г/г смолы за цикл. Для сочетания аминокислот в ходе цикла используется в среднем 7,25 мл/г смолы раствора для соединения с плотностью около 1 г/мл, что составляет в среднем 7,25 г/г смолы за цикл. После сочетаний проводят в среднем 5 промывок DMF на 9 мл/г смолы с плотностью 0,945 г/мл, в среднем 42,5 г/г смолы за цикл.

Всего в ходе каждого цикла расходуется в среднем 137 г материалов на грамм смолы. При выполнении 39 циклов для получения промежуточного соединения с основной цепью из 39 аминокислот (фиг. 7) на грамм смолы используется 5356 г материалов. Поскольку молярная емкость смолы Зибера составляет 0,7 ммоль/г, суммарная общая масса используемых материалов на ммоль смолы (включая массу самой смолы) составляет около 7650 г/ммоль.

Снятие защиты Lys-ivDde (20), сочетание с формулой I, отщепление смолы, выделение неочищенного продукта.

Остальные стадии для снятия защиты Lys-ivDde, сочетания с кислотой формулы I, отщепления от смолы и выделения неочищенного тирзепатида осуществляют по существу так же, как описано для серийного получения в реакторах. Всего было получено 45,39 кг неочищенного тирзепатида с чистотой 45 вес.% и 64% чистоты по ВЭЖХ. Содержащийся выход в расчете на смолу Зибера=47%.

Сравнение способов.

Аналогичные выходы сырья получают при периодическом и серийном производстве тирзепатида (47% и 48%, соответственно). Для способа с последовательными реакторами общее количество материалов (растворители плюс реагенты плюс смола) составляет 5,42 кг на ммоль исходной смолы для получения промежуточного соединения с 39-мерной основной цепью (фиг. 7). В периодическом способе на ммоль исходной смолы используется всего 7,65 кг материалов.

Пример. Получение фрагмента с рециркуляцией DMF и уменьшенными эквивалентами реагентов.

Последовательная установка из трех реакторов была усовершенствована и использована для синтеза пептида, содержащего первые 10 аминокислотных остатков основы тирзепатида, который представляет собой GPSSGAPPPS-NH-Смола, однако каждая из S-аминокислот защищена трет-бутильной группой.

Установка оборудования была такой же, как показано на фиг. 3, за исключением небольших изменений, при которых перистальтические насосы (435) на фиг. 3 были заменены на систему передачи давления. Вместо откачки растворителя данная система создает вакуум в передаточной емкости, а затем открывает впускной клапан нужного реактора (RB1, RB2 или RB3). Датчик давления применяют для определения полного опорожнения реактора, поскольку давление будет быстро увеличиваться, как только он начнет втягивать в емкость азот, а не растворитель. Затем в перекачивающую емкость подают давление и открывают клапан для необходимого реактора (RB2, RB3 или отходы/рециркулирование). Данный способ обеспечивает более быстрое и полное опорожнение реакторов, в результате чего в реакторах после опорожнения остается меньше растворителя, что улучшает промывку смолы. Другим отличием является добавление онлайн-ГХ (газового хроматографа) для измерения пиперидина для обеспечения достаточной промывки и переработки бутылки с DMF.

Что касается сходства с системой на фиг. 3, три реактора были установлены последовательно, при этом стоки из первого реактора направлялись во второй реактор, из второго - в третий, а из третьего - в отходы. Тем не менее, последовательно проводились только операции промывки. В данном эксперименте также использовали улучшенные условия как для реакций снятия защиты с Fmoc, так и для реакций сочетания аминокислот. Новые условия реакции позволяли устранить подавляющее большинство избыточных реагентов и делали концепцию последовательного проведения реакций снятия защиты и связывания минимально выгодной. Для снятия защиты с Fmoc использовали только одну загрузку 20% пипе-

ридина в DMF. Объем данной загрузки уменьшали примерно до четырех объемов (исходя из сухой загрузки смолы). На данный момент количество отходов пиперидина сокращается примерно на 80% по сравнению с первоначальным процессом, в котором использовалось более трех независимых 9-объемных загрузок в один реактор. Потенциальная экономия пиперидина при последовательном выполнении данной операции была сочтена не стоящей потенциальных проблем, которые могут возникнуть в результате накопления побочного продукта снятия защиты (пиперидина - дибензофульвенового аддукта) в третьем реакторе. Таким образом, каждый реактор работал независимо для реакции снятия защиты Fмос.

Для еще большего сведения к минимуму PMI систему модифицировали и добавляли емкость для рециркуляции DMF. (PMI означает массовую интенсивность процесса и определяется как общая масса материала, используемого для получения определенного количества продукта, поэтому 2000 г материала для получения 1 г продукта представляет собой PMI 2000). Резервуар рециркуляции используют для сбора второй половины промывок после снятия защиты с Fмос и он находится после третьего реактора, поскольку все промывки выполняются последовательно. Например, рециркуляционный сосуд собирал последние пять из десяти промывок. Собранный DMF имеет концентрацию пиперидина порядка 1%. Поскольку это значительно ниже, чем концентрация пиперидина в реакторе после реакции снятия защиты, собранный DMF используют в первой половине последующего цикла промывки. Это приводит к лучшему использованию DMF, увеличивая среднюю концентрацию пиперидина в потоке отходов. Дополнительное изменение в промывке добавляли в связи с необходимостью промывки оборудования для онлайн-ЖХМС (описанного ранее) во избежание переноса пробы. В результате промывки оборудования для ЖХМС в каждом из трех реакторов остается около 80 мл DMF. После этого в каждый реактор быстро наливают примерно 50 мл свежего DMF, для смывания смолы, оставшейся на стенках, в слой смолы. Онлайн-ЖХ-МС и промывки шаровыми распылителями интегрированы в программу последовательной промывки реактора, в которой весь используемый DMF проходит через реакторы последовательно и учитывается в окончательном расчете PMI.

Ранее, на фиг. 3, перистальтические насосы использовались для перекачки материала из одного реактора в другой. Иногда перистальтические насосы не полностью осушали реактор от свободного растворителя. Это снижает эффективность промывки и увеличивает PMI. Соответственно, было внесено изменение в использование передачи давления для лучшего удаления всей жидкости из реактора. Добавляли один передаточный сосуд, соединенный со всеми реакторами, отходами и сосудом для рециркуляции DMF. Для переноса из реактора в перегрузочную емкость используется автоматизированная последовательность. На сосуд для переноса нагнетается вакуум и открывается клапан между дном сосуда и перекачивающей емкостью. Клапан закрывается, когда давление в передаточной емкости достигает заданного значения. Передаточная емкость находится под давлением, открывается клапан, ведущий к верхней части целевой емкости, и передача происходит до тех пор, пока давление в передаточной емкости не упадет ниже заданного значения.

Также был добавлен онлайн-анализ промывочных растворов. Для контроля остаточного содержания пиперидина в промывках в отходящей линии была установлена онлайн-ГХ. Программа была настроена таким образом, чтобы анализировались последние три промывки из третьего реактора. Кроме того, онлайн-ЖХМС использовалась для отбора проб на остатки аминокислот при промывке после соединения. Для предотвращения снижения выхода смолы давали осесть перед запуском промывочной пробы. Это предотвращало отбор проб смолы, так как погружная трубка находилась в слое жидкости над смолой.

Точные расчеты PMI получали для каждого цикла. В рамках данного эксперимента все пробы для мониторинга реакции были взяты из третьего реактора, так как ожидалось, что в нем будут протекать самые медленные реакции вследствие наибольшего количества остаточных материалов в связи с более низкой эффективностью промывки. После завершения реакций в третьем реакторе предполагается, что все три реактора будут полными. Это также помогает с проблемами переноса в онлайн-ЖХ-МС, поскольку каждый образец будет лишь незначительно затронут переносом. В случае предположения о 5%-ном переносе реакция сочетания, которая завершена на 100%, может быть завершена только на 95% вследствие 5%-ного переноса образца предыдущей реакции снятия защиты. Если пробы из каждого из трех реакторов отбирают последовательно, то данная 5% ошибка может преобладать в каждой из проб, и через три часа реакция все еще не будет завершена. Если отбирают пробу только из одного реактора, предполагая полное преобразование, преобразование первой пробы составит 95%, но вторая проба измерит 99,75% преобразования, и реакция может быть остановлена только через два часа. Экспериментальная история показывает, что реакция, которая длится дольше, чем необходимо, особенно в отношении реакции снятия защиты Fмос, ухудшает качество. Риск отбора проб только из одного реактора воспринимается как незначительный по сравнению с потенциальным улучшением качества, которое может произойти в результате остановки реакции по ее завершении без чрезмерного дополнительного времени перемешивания.

В данном эксперименте целью было снижение концентрации пиперидина до 2000 ppm с использованием 10 циклов промывки. Результаты промывок после снятия защиты пиперидином представлены в табл. 10. Использовали модель для прогнозирования количества моющих средств, необходимых для по-

лучения примерно 2000 ppm пиперидина после 10 промывок и цикла очистки тележки для проб. При моделировании использовались предыдущие экспериментальные данные по набуханию смолы и адсорбции пиперидина. Некоторые пробы были пропущены вследствие неисправностей оборудования, но целевой показатель в 2000 ppm обычно выполнялся, единственным исключением был заключительный цикл.

Таблица 10  
Результаты промывки пиперидина

№ цикла синтеза	Снятие защиты AA	№ промывки	Концентрация пиперидина (ppm)
1	Смола Зибера	10	1804
1	Смола Зибера	Очистка тележки для проб	950
2	Ser 39	10	2100
2	Ser 39	Очистка тележки для проб	1003
3	Pro 38	10	3605
3	Pro 38	Очистка тележки для проб	1723
4	Pro 37	10	5215
4	Pro 37	Очистка тележки для проб	2013
5	Pro 36	9	4164
5	Pro 36	10	4132
5	Pro 36	Очистка тележки для проб	1715
6	Ala 35	9	3393
6	Ala 35	10	1605
7	Gly 34	9	3473
7	Gly 34	10	1452
8	Ser 33	9	3871
9	Ser 32	9	4069
9	Ser 32	Очистка тележки для проб	1927
10	Pro 31	9	4982
10	Pro 31	10	4232
10	Pro 31	Очистка тележки для проб	3048

После реакций сочетания систему последовательно промывали тремя промывочными нагрузками. После этого использовали ту же процедура очистки тележки для проб. Хорошая методика количественного определения остаточной AA не была разработана, поэтому по мере роста пептида и увеличения удерживания растворителя использовали все большее количество DMF на одну промывку.

Мониторинг реакции проводили на третьем реакторе в серии. Система онлайн-ЖХ-МС использовали в соответствии с предыдущим экспериментом. Результаты снятия защиты приведены в табл. 11. Понимая, что методология количественного определения смещена в сторону занижения результатов, а также тот факт, что анализ образца отстает от фактической реакции на час, перед остановкой реакции и дальнейшими действиями необходимо было достичь преобразования 98%. К моменту двухчасовой обработки образца все снятия защиты соответствовали порогу для продолжения. Время обработки составляет чуть более одного часа.

Таблица 11  
Результаты реакции снятия защиты

Цикл	Снятие защиты AA	≈15 мин.	≈65 мин.	≈115 мин.
1	Смола Зибера	N/A	N/A	N/A
2	Ser 39	93,2%	94,8%	98,6%
3	Pro 38	100,0%	97,5%	99,0%
4	Pro 37	98,5%	99,1%	99,7%
5	Pro 36	97,9%	98,9%	99,5%
6	Ala 35	97,3 %	98,3%	99,3%
7	Gly 34	98,5%	98,8%	99,8%
8	Ser 33	98,5%	99,1%	N/A
9	Ser 32	N/A	99,1%	N/A
10	Pro 31	99,0%	99,4%	N/A

Аналогичный мониторинг был проведен для реакций сопряжения. Результаты приведены в табл. 12. Все сочетания, кроме Gly 30, были остановлены не позднее того момента, когда стал известен результат двухчасовой пробы. Преобладающей теорией низкого преобразования соединения Gly 30 был высокий уровень остаточного пиперидина, присутствующего после промывки. Для реакции Gly 30 проводили

перегруппировку, которая быстро довела конверсию сопряжения до 99,2%, и реакцию останавливали.

Таблица 12

## Результаты реакции сочетания

Цикл	Сочетание AA	≈15 мин.	≈65 мин.	≈115 мин.
1	Ser 39	N/A	N/A	N/A
2	Pro 38	93,8%	100,0%	N/A
3	Pro 37	95,5%	99,4%	N/A
4	Pro 36	83,9%	98,5%	97,9%
5	Ala 35	80,6%	97,9%	100,0%
6	Gly 34	73,2%	95,1%	100,0%
7	Ser 33	N/A	N/A	99,8%
8	Ser 32	63,5%	90,1%	100,0%
9	Pro 31	N/A	99,7%	N/A
10	Gly 30	N/A	68,8%	78,4%

Основное внимание в этом эксперименте уделяли получению качественного материала с минимальным количеством сырья. Количество материалов, использованных в снятии защиты для каждого цикла, приведено в табл. 13. Количество материала указано в г/ммоль для каждого цикла. Поскольку ммоль пептида уменьшается каждый цикл, ни суммирование общего использования материала за 10 циклов и деление на конечный ммоль, ни исходное количество ммоль не даст точного числа.

Таблица 13

## Материал, используемый для снятия защиты

№ цикла	Снятие защиты AA	Объемы Pip/DMF			Использование пиперидина		DMF в 20% растворе Pip	
		RB1	RB2	RB3	г	г/ммоль	G	г/ммоль
1	Смола	4,3	4,1	4,0	142	0,9	627	4,2
2	Ser 39	4,7	4,7	4,7	160	1,1	704	4,8
3	Pro 38	4,8	4,7	4,7	159	1,1	702	4,8
4	Pro 37	3,8	3,9	3,8	285	2,0	1254	8,7
5	Pro 36	4,8	4,9	4,7	157	1,1	691	4,9
6	Ala 35	4,8	4,8	4,7	151	1,1	667	4,8
7	Gly 34	4,4	4,6	4,6	143	1,0	629	4,6
8	Ser 33	4,7	4,7	4,6	145	1,1	637	4,7
9	Ser 32	4,4	4,4	4,3	134	1,0	589	4,4
10	Pro 31	4,1	4,3	4,2	128	1,0	563	4,2
	Всего				1603	11,3	7062	49,9
	Среднее				160	1,1	706	5,0

Использование DMF для промывки после снятия защиты показано в табл. 14. Табл. 15 перечислены молярные эквиваленты связующих реагентов, используемых для каждого цикла для каждого из трех реакторов. Общее количество материалов, использованных для каждого цикла соединения, указано в табл. 16. В табл. 17 показано использование DMF для промывки после сочетания.

Таблица 14

## Материал, используемый для промывки после снятия защиты

№ цикл а	Снятие защиты AA	Сред. рекомендуемый объем промывки DMF			Сред. объем свежей промывки DMF			Промывка DMF		Очистка тележки для проб DMF	
		RB 1	RB 2	RB 3	RB 1	RB 2	RB 3	г	г/ммол	г	г/ммол
1	Смола	4,2	4,3	4,3	2,9	2,9	2,9	927	6,2	376	2,5
2	Ser 39	3,9	4,0	3,9	4,1	4,2	4,2	1279	8,7	416	2,8
3	Pro 38	5,4	5,3	5,4	4,2	4,2	4,2	1286	8,8	374	2,6
4	Pro 37	5,3	5,2	5,2	4,2	4,3	4,3	1273	8,9	374	2,6
5	Pro 36	5,3	5,3	5,3	4,9	4,9	4,9	1474	10,4	372	2,6
6	Ala 35	6,0	5,9	6,0	4,9	4,9	4,9	1448	10,4	369	2,6
7	Gly 34	6,1	6,0	6,1	5,0	5,0	5,0	1447	10,5	368	2,7
8	Ser 33	6,1	6,1	6,1	5,0	4,9	4,9	1443	10,6	338	2,5
9	Ser 32	6,2	6,1	6,3	5,2	5,1	5,1	1457	10,8	383	2,8
10	Pro 31	6,2	6,2	6,5	4,6	4,5	4,5	1266	9,5	263	2,0
	Всего							1330 2	94,8	363 3	25,7
	Среднее							1330	9,5	363	2,6

Таблица 15

## Молярные эквиваленты используемых связующих реагентов

№ цикла	Сочетание AA	Экв. AA			Экв. Охума			Экв. DIC		
		RB1	RB2	RB3	RB1	RB2	RB3	RB1	RB2	RB3
1	Ser 39	1,36	1,41	2,52	1,39	1,44	2,57	1,53	1,59	2,83
2	Pro 38	1,42	1,50	1,49	1,42	1,50	1,48	1,58	1,67	1,65
3	Pro 37	1,43	1,49	1,55	1,43	1,49	1,55	1,59	1,66	1,72
4	Pro 36	1,43	1,50	1,55	1,43	1,50	1,55	1,59	1,67	1,72
5	Ala 35	1,43	1,51	1,55	1,42	1,50	1,55	1,58	1,67	1,72
6	Gly 34	1,43	1,51	1,56	1,42	1,50	1,56	1,58	1,67	1,73
7	Ser 33	1,43	1,51	1,57	1,42	1,50	1,56	1,57	1,66	1,73
8	Ser 32	1,43	1,50	1,56	1,43	1,50	1,56	1,58	1,66	1,73
9	Pro 31	1,49	1,49	1,47	1,50	1,50	1,48	1,66	1,66	1,63
10	Gly 30	2,25	1,96	2,14	2,23	1,94	2,12	2,48	2,16	2,36

Таблица 16

## Общее количество использованных реагентов для сочетания

№ цикла	Сочетание AA	AA		Охума		DIC		DMF для раствора для сочетания	
		г	г/ммоль	г	г/ммоль	г	г/ммоль	г	г/ммоль
1	Ser 39	101	0,68	38	0,26	37	0,25	932	6,3
2	Pro 38	77	0,53	31	0,21	30	0,21	771	5,3
3	Pro 37	76	0,53	31	0,21	30	0,21	762	5,3
4	Pro 36	75	0,53	30	0,21	30	0,21	751	5,3
5	Ala 35	69	0,49	30	0,21	29	0,21	748	5,3
6	Gly 34	61	0,44	29	0,21	29	0,21	740	5,3
7	Ser 33	78	0,57	29	0,21	28	0,21	716	5,2
8	Ser 32	77	0,57	29	0,21	28	0,21	707	5,2
9	Pro 31	70	0,53	28	0,21	28	0,21	704	5,3
10	Gly 30	83	0,62	39	0,30	39	0,29	1001	7,6
	Всего	768	5,5	313	2,2	308	2,2	7833	55,9
	Среднее	77	0,55	31	0,22	31	0,22	783	5,59

Таблица 17

## Применение DMF для промывки после сочетания

№ цикла	Сочетание AA	Сред. объем промывки DMF			Применение промывки DMF		Очистка тележки для проб DMF	
		RB1	RB2	RB3	г	г/ммоль	г	г/ммоль
1	Ser 39	5,2	6,3	7,0	1276	9,10	373	2,52
2	Pro 38	3,5	4,3	4,7	892	6,44	366	2,49
3	Pro 37	3,4	4,4	5,0	924	6,75	389	2,69
4	Pro 36	4,3	5,4	6,3	1068	7,92	361	2,53
5	Ala 35	4,4	5,4	5,9	1041	7,81	368	2,61
6	Gly 34	5,0	5,9	6,5	1148	8,77	373	2,69
7	Ser 33	5,0	6,0	6,6	1155	8,93	354	2,60
8	Ser 32	5,0	6,0	6,6	1134	8,87	361	2,67
9	Pro 31	4,5	6,5	6,9	1327	10,50	357	2,68
10	Gly 30	4,6	6,4	7,2	1058	8,48	370	2,81
	Всего				11024	83,6	3671	26,3
	Среднее	4,49	5,65	6,27	1102	8,36	367	2,63

Учитывая данные с каждой стадии, создавали сводку, в которой использование сырья, по соединениям и в целом, сравнивается с текущим производственным процессом партии. В табл. 18 показано, что использование связывающего реагента сократилось на 37%, тогда как использование пиперидина сократилось на 84%. DMF, используемый для промывки, представляет собой подавляющее большинство материалов, используемых в процессе, на его долю приходится более 90% общего массового расхода, и основной целью данного эксперимента было снижение потребления DMF. Использование DMF сократилось на 79% по сравнению с первыми десятью циклами процесса серийного производства тирзепатида. Всего при экспериментальной демонстрации нового технологического процесса было использовано 357 г/ммоль пептида. Для сравнения, в текущем процессе серийного производства используется 1690 г/ммоль. Это представляет собой общее сокращение на 79%.

Таблица 18

Общий объем материала, использованного в 10-мерном ТФСР серийно и партиями

№ цикла	г/ммоль DMF		г/ммоль пиперидина		г/ммоль AA		г/ммоль Охума		г/ммоль DIC		Всего г/ммоль	
	Серия	Партия	Серия	Партия	Серия	Партия	Серия	Партия	Серия	Партия	Серия	Партия
1	30,8	150	1,0	6,2	0,68	0,96	0,26	0,36	0,25	0,35	32,9	157
2	30,4	150	1,1	6,2	0,53	0,89	0,21	0,36	0,21	0,35	32,5	157
3	30,9	159	1,1	8,3	0,53	0,89	0,21	0,36	0,21	0,35	32,9	168
4	35,9	159	2,0	8,3	0,53	0,89	0,21	0,36	0,21	0,35	(38,8)	168
5	33,6	159	1,1	8,3	0,49	0,82	0,21	0,36	0,21	0,35	35,6	168
6	34,6	150	1,1	6,2	0,44	0,74	0,21	0,36	0,21	0,35	36,5	157
7	34,5	150	1,0	6,2	0,57	0,96	0,21	0,36	0,21	0,35	36,5	156
8	34,5	161	1,1	6,2	0,57	0,96	0,21	0,36	0,21	0,35	(36,6)	168
9	36,5	184	1,0	6,2	0,53	0,89	0,21	0,36	0,21	0,35	38,4	191
10	34,6	193	1,0	8,3	0,62	0,74	0,30	0,36	0,29	0,35	36,7	202
<b>Общее</b>	<b>(33,6,2)</b>	<b>161,4</b>	<b>11,3</b>	<b>7,0,2</b>	<b>5,47</b>	<b>8,7,4</b>	<b>2,24</b>	<b>3,55</b>	<b>2,2,0</b>	<b>3,4,7</b>	<b>(35,7,4)</b>	<b>169,1</b>
<b>Среднее</b>	<b>(33,6)</b>	<b>161</b>	<b>1,1</b>	<b>7,0</b>	<b>0,55</b>	<b>0,8,7</b>	<b>0,22</b>	<b>0,36</b>	<b>0,2,2</b>	<b>0,3,5</b>	<b>(35,7)</b>	<b>169</b>
<b>% снижения</b>	<b>79%</b>		<b>84%</b>		<b>37%</b>		<b>37%</b>		<b>37%</b>		<b>79%</b>	

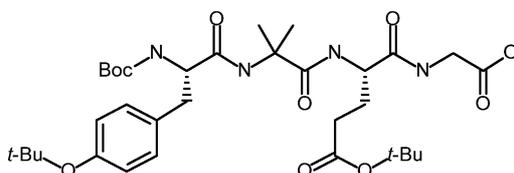
Установив снижение расхода материала почти на 80%, заключительная часть эксперимента должна была продемонстрировать высокое качество полученного материала. Материал из всех трех реакторов подвергся мягкому отщеплению пептида от смолы с сохранением всех защитных групп на группах AA R. Анализ ВЭЖХ, приведенный в табл. 19, показал высокое качество во всех трех реакторах. Было неожиданно обнаружено, что между качеством и реактором не было абсолютно никакой связи. Гипотеза заключалась в том, что в трех реакторах будет незначительное снижение чистоты, поскольку третий последовательный реактор промывается не так сильно, как первый. Данное открытие доказывает, что использованная стратегия промывки была неадекватной. Теоретически целевые показатели промывки остаточного пиперидина и АК можно было бы увеличить, что позволило бы еще больше снизить расход материала.

Таблица 19

Данные о чистоте согласно ВЭЖХ для каждого реактора

Примесь	desSer 32	des2xPro 36	desPro 36	desAlaPro 36	10me r	4xPro3 6	desAla 35	2xPro3 1	2xGly3 4	3xSer3 2
Удержание	4,48	6,32	6,85	6,97	7,12	7,30	7,40	7,53	7,77	9,59
Реактор 1	1,38%	1,26%	0,24%	0,52%	94,02%	0,81%	0,24%	0,37%	0,46%	HO
Реактор 2	0,98%	1,16%	0,32%	0,67%	94,54%	0,67%	0,08%	0,39%	0,17%	0,14%
Реактор 3	1,48%	1,27%	0,15%	0,56%	94,30%	0,74%	0,13%	0,43%	0,13%	0,14%

Пример. Конструирование тетрамера терзепатида посредством ТФСР в растворителе DMF. Следующий тетрамер терзепатида содержит 4 аминокислоты:



Данный тетрамер синтезируют с использованием линейного твердофазного пептидного синтеза

(ТФСР), достигаемого посредством способа загрузки и способа последовательных реакторов, описанного в следующем тексте. В табл. 20 приведена последовательность 4 аминокислот, использованных для синтеза основной цепи тетрамера тирзепатида. Следует отметить, что первая аминокислота глицин промежуточного соединения тетрамера первоначально наносится на твердую подложку из смолы 2-хлортрихлорида (СТС), как показано ниже, с использованием способа загрузки (твердые вещества смолы СТС показан кружком ниже).

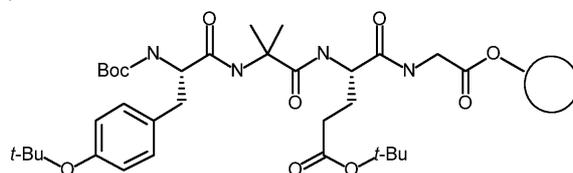


Таблица 20

Порядок 4 аминокислот, используемых в синтезе тетрамера тирзепатида посредством ТФСР

Порядок добавления аминокислоты (АА)	Положение АА на пептиде	Название АА	АА, используемая на стадии соединения
1	4	Глицин	Fmoc-Gly-OH
2	3	Глутаминовая кислота	Fmoc-Glu(tBu)-OH
3	2	2-аминоизомаляная кислота	Fmoc-Aib-OH
4	1	Тирозин	Boc-Tyr(tBu)-OH

Остальные 3 аминокислоты построены с использованием способа реакторов в серин,  $\alpha$ -азот глицина, глутаминовой кислоты и 2-аминоизомаляной кислоты защищены 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой, а  $\alpha$ -азот тирозина защищен *t*-бутилоксикарбониллом (Boc). Кислород глутаминовой кислоты и тирозина защищен трет-бутилом (tBu).

Способ загрузки.

Готовят раствор для сочетания Fmoc-Gly-OH: В бутылки с образцом объемом 5000 мл растворяют Fmoc-Gly-OH (142,7 г, 480,0 ммоль) в DMF до объема раствора 1,8 л. Затем добавляют *N*-этил-*N*-изопропилпропан-2-амин (309 г, 2390,9 ммоль) и перемешивают содержимое в течение 5 мин.

Сочетание смолы.

В стеклянную крупномасштабную установку для синтеза пептидов объемом 10 л добавляют смолу СТС (380 г, 610 ммоль, 1,6 ммоль/г). Добавляют DMF (2400 мл) и перемешивают в течение 15 мин. Оставшийся раствор сливают и выбрасывают. Смолу промывают с использованием DMF (2400 мл) в течение 15 мин, дважды перемешивают. Добавляют дополнительное количество *N*-этил-*N*-изопропилпропан-2-амин (62 г, 479,73 ммоль) и перемешивают при температуре окружающей среды в течение 18 ч. По окончании 18 ч сливают раствор и смолу промывают с использованием DMF (1800 мл) пять раз по 5 мин при перемешивании.

Кэпирование смолы.

Добавляют DMF (900 мл), *N*-этил-*N*-изопропилпропан-2-амин (145,8 г, 1128 ммоль) и метанол (191 г, 5960,9 ммоль) в колбу и перемешивают при комнатной температуре в течение 2 мин. Добавляют раствор к смоле и перемешивают в течение 60 мин, а затем раствор сливают. Промывают смолу с использованием DMF (1800 мл) 5 раз по 5 мин при перемешивании каждый раз. Кроме того, смолу промывают с использованием DCM (1800 мл) 5 раз по 5 мин при перемешивании каждый раз. Смолу переносят на сушильный диск и высушивают в вакууме при 35°C до постоянной массы.

Масса сухой смолы составляет 473,37 г с содержанием Fmoc-Gly-OH 0,85 ммоль/г, измеренным посредством ЯМР.

Способ с последовательно расположенными реакторами.

Подготовка сырья.

Готовят 20-процентный раствор пиперидина в DMF следующим образом: разбавляют пиперидин (2,0 л) до объема 10,0 л посредством добавления DMF с получением 20% раствора по объему.

Готовят раствор Охута в DMF с концентрацией 1,25 моль/кг следующим образом: растворяют этил(гидроксиимино)цианоацетат (оксима, 195,69 г) в DMF (905,91 г) до получения раствора с концентрацией 1,25 моль/кг, затем пропускают через раствор азот при температуре 2 стандартных кубических футов в час.

Готовят раствор DIC с концентрацией 1,25 моль/кг в DMF следующим образом: растворяют *N,N*-5-диизопропилкарбодиимид (191,16 г) в DMF (1020,60 г) до получения раствора с концентрацией 1,25 моль/кг, затем пропускают через раствор азот при температуре 2 стандартных кубических футов в час.

Готовят раствор 0,40 моль/кг глутаминовой кислоты в DMF следующим образом: растворяют Fmoc-Glu(tBu)-OH (162,85 г) в DMF (755,15 г), встряхивают до растворения, а затем через раствор пропускают

азот при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят раствор Fmoc-Aib-OH в DMF с концентрацией 0,40 моль/кг следующим образом: растворяют Fmoc-Aib-OH (119,50 г) в DMF (798,51 г), встряхивают до растворения, а затем пропускают через раствор азот при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят раствор Boc-Tyr(tBu)-OH в DMF с концентрацией 0,40 моль/кг следующим образом: растворяют Boc-Tyr(tBu)-OH (123,89 г) в DMF (794,11 г), встряхивают до растворения, а затем барботируют азотом через раствор при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят реакционную систему следующим образом: добавляют смолу CTC (108 г, 0,85 ммоль/г, 91,8 ммоль), поровну распределяя между реакторами "RB1", "RB2" и "RB3". Добавляют 350 мл DMF в каждый реактор и перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч для набухания смолы.

Общая процедура А - Процесс снятия защиты Fmoc и промывки DMF.

Удаление защиты Fmoc проводят параллельно для всех трех реакторов, RB1, RB2 и RB3. Более конкретно, в RB1 добавляют раствор пиперидина (20 об.% в DMF, 202,4 г) и промывают линию передачи пиперидина 5 мл DMF и начинают перемешивание. Аналогичным образом добавляют 205,4 г и 205,2 г 20 об.% раствора пиперидина в RB2 и RB3 и промывают линию пиперидина соответственно. Затем три реактора перемешивают в течение 120 мин при 20°C для снятия защиты параллельно одновременно. Загрузка раствора пиперидина для всей сборки тетрамера TZP представлена в табл. 21. Реакцию снятия защиты отслеживают посредством онлайн-ЖХ-МС, поддерживаемой тележкой для проб. Конверсию снятия защиты невозможно определить количественно, поскольку масс-спектр промежуточного соединения тетрамера со снятой защитой нельзя свести в таблицу вследствие его низкой молекулярной массы. Тем не менее, завершение снятия защиты качественно проверяется, для подтверждения того, что пики извлеченных ионов тетрамера, защищенного Fmoc, равны нулю.

После снятия защиты растворы сливают из всех трех реакторов в бак для отходов, используя систему передачи давления. Отмечается, что промывка с использованием DMF после снятия защиты проводится с использованием последовательно расположенных реакторов, т. е. растворитель для промывки с использованием DMF сначала загружают в RB1, а затем переносят в RB2 и в RB3. Для удаления остаточного пиперидина из смолы применяют 10 циклов промывки DMF в соответствии со следующей подробной процедурой. Для первых 5 промывок с использованием DMF рециркулированный DMF добавляют в RB1 из сосуда для рециркуляции DMF с поровну разделенной массой растворителя и перемешиванием (т.е. массу DMF в сосуде для рециркуляции поровну делят на 5 циклов промывки и загружают в RB1). После опорожнения сосуда для рециркуляции DMF и завершения первых пяти рециркуляционных промывок DMF свежий DMF из сосуда для растворителя DMF загружают для оставшихся 5 циклов промывки. Использованный DMF из первых 5 циклов промывки выбрасывается в резервуар для отходов, а использованный растворитель DMF из оставшихся 5 циклов промывки собирается в резервуар для рециркуляции DMF, который будет повторно использован в следующем процессе получения аминокислот. Время перемешивания составляет 5 мин в течение всего цикла стирки. После завершения 10 циклов промывки применяют дополнительный цикл очистки тележки для проб, в которой 100 мл свежего DMF загружают в три реактора соответственно. Затем DMF из RB1 и RB2 переносят в RB3, который окончательно собирается в сосуде рециркуляции растворителя DMF. Использование материалов для промывки DMF после снятия защиты кратко изложено в табл. 22. Концентрация пиперидина в растворе DMF, сливом из последних трех циклов промывки, измеряют посредством онлайн-ГХ, которая кратко изложена в табл. 23. На протяжении всего синтеза конечную остаточную концентрацию пиперидина контролируют на уровне менее 500 ppm.

Таблица 21

Материал, используемый для снятия защиты

№ цикла	Снятие защиты AA	Объемы Pip/DMF			Использование пиперидина		DMF в 20% растворе Pip	
		RB 1	RB 2	RB 3	г	г/ммоль	г	г/ммоль
1	Gly 4	6,2	6,2	6,2	114,4	1,2	500,4	5,5
2	Glu 3	5,0	5,2	5,2	109,2	1,2	477,2	5,3
3	Aib 2	5,4	5,4	5,3	119,8	1,4	524,0	6,0
	Всего	16,5	16,7	16,7	343,4	3,8	1501,6	16,7
	Среднее	5,5	5,6	5,6	114,5	1,3	500,5	5,6

Таблица 22

## Использование материала для промывки после снятия защиты

№ цикла	Снятие защиты AA	Сред. рекомендуемый объем промывки DMF			Сред. объем свежей промывки DMF			Промывка DMF		Очистка тележки для проб DMF	
		RB1	RB2	RB3	RB1	RB2	RB3	г	г/ммоль	г	г/ммоль
1	Gly 4	9,7	9,7	9,7	8,3	8,3	8,3	1133,1	12,4	314,3	3,4
2	Glu 3	8,2	8,2	8,3	6,0	6,0	6,1	984,2	11,0	346,8	3,9
3	Aib 2	6,6	6,6	6,7	6,4	6,4	6,5	1115,9	12,8	351,2	4,0
	Всего	24,5	24,5	24,7	20,7	20,7	20,9	3233,2	36,2	1012,3	11,3
	Среднее	8,2	8,2	8,2	6,9	6,9	7,0	1077,7	12,1	337,4	3,8

Таблица 23

## Остаточная концентрация пиперидина для промывки после снятия защиты

Цикл синтеза	Снятие защиты с AA	№ промывки	PPM
1	Gly 4	9-я	нет данных
1	Gly 4	10-я	нет данных
1	Gly 4	Промывка для очистки пробы	369,1
2	Glu 3	9-я	535,7
2	Glu 3	10-я	506,1
2	Glu 3	Промывка для очистки пробы	337,8
3	Aib 2	9-я	555,8
3	Aib 2	10-я	474,2
3	Aib 2	Промывка для очистки пробы	409,7

Общая процедура В - активация аминокислот и процесс сочетания.

В реактор с оболочкой RA добавляют раствор глутаминовой кислоты (0,4 моль/кг, 401,2 г), раствор Охута (1,25 моль/кг, 128,5 г), раствор DIC (1,25 моль/кг, 141,2 г). Раствор перемешивают при 20°C в течение 30 мин для образования активированного раствора глутаминовой кислоты и добавляют в RB1 (225,4 г), RB2 (225,4 г) и RB3 (227,4 г). Перемешивают реакторы RB1, RB2 и RB3 в течение 8 ч при 20°C за исключением реакции сочетания тирозина, для которой время сочетания составляет 18 ч. После достижения времени соединения раствор сливают из всех трех реакторов в резервуар для отходов посредством передачи давления. В конце реакции завершение сочетания подтверждают посредством критерия Кайзера. Использование материалов для сцепки обобщено в табл. 24, в которой подробно описано использование эквивалентного соотношения на протяжении всей сборки.

Промывают реакторы RA, RB1, RB2 и RB3 в течение трех циклов с использованием свежего DMF после соединения аналогичным способом с последовательно расположенными реакторами в общей процедуре А. Более конкретно, добавляют свежий растворитель DMF в RA через распылительный клапан, а затем последовательно в RB1, RB2 и RB3. Следует отметить, что процедура очистки тележки для проб проводится аналогично общей процедуре А. После этого весь использованный DMF из трех циклов промывки DMF и дополнительного цикла очистки тележки для образцов выбрасывается в резервуар для отходов. Использование материалов для промывки с использованием DMF после соединения кратко изложено в табл. 25.

Таблица 24

## Использование материалов для сочетания

№ цикла	Сочетание AA	Экв. AA			Экв. Охута			Экв. DIC		
		RB1	RB2	RB3	RB1	RB2	RB3	RB1	RB2	RB3
1	Gly 4	1,77	1,77	1,79	1,77	1,77	1,79	1,96	1,95	1,96
2	Glu 3	1,80	1,80	1,86	1,81	1,81	1,86	2,02	1,98	2,05
3	Aib 2	1,84	1,84	1,91	1,84	1,84	1,84	1,91	2,02	2,10
	Всего	5,4	5,4	5,6	5,4	5,4	5,5	5,9	6,0	6,1
	Среднее	1,8	1,8	1,9	1,8	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0

Таблица 25

## Использование материалов для промывки после сочетания

№ цикла	Сочетание AA	Сред. объем промывки DMF			Применение промывки DMF		Очистка тележки для проб DMF	
		RB1	RB2	RB3	г	г/ммоль	г	г/ммоль
1	Gly 4	6,2	6,2	6,3	527,7	5,9	341,9	3,8
2	Glu 3	6,7	6,7	6,9	557,2	6,4	368,8	4,2
3	Aib 2	7,5	7,5	7,8	609,5	7,1	340,8	4,0
	Всего	20,4	20,4	20,9	1694,4	19,3	1051,5	12,0
	Среднее	6,8	6,8	7,0	564,8	6,4	350,5	4,0

Способ анализа чистоты тетрамера TZP.

После присоединения Вос-Туг 1 смолу переносят из всех трех реакторов на сушильные диски, отделяют от смолы посредством промывки хлористым метиленом и сушат. Образец тетрамера мягко отщепляется с использованием tBu, на пептиде остается защитная группа Вос, и его чистоту анализируют посредством следующего способа. На каждые 500 мг пептида на смоле добавляют 10 мл 30% гексафтор-2-пропанола/метилхлорида (об./об.) в сцинтилляционной пробирке. Смешивают на роторном миксере в течение 2 ч. Отфильтровывают и промывают смоляной осадок 10 мл хлористого метилена. Концентрируют в масло посредством выпаривания. Тетрамерное масло далее разбавляют 50% ацетонитрилом/водой (об./об.) для СВЭЖХ-МС анализа. Полученная чистота тетрамера TZP для RB1, RB2 и RB3 составляет 99,23%, 99,58% и 99,39% соответственно.

Периодический способ синтеза тетрамера TZP.

Периодический процесс тетрамера TZP при 600 ммоль описан ниже для сравнения с технологией с последовательно расположенными реакторами. Отмечается, что для периодического процесса используется один реактор периодического действия вместо трех последовательных реакторов периодического действия, используемых в новой технологии. Использование материалов обобщено в табл. 26.

Загрузка Fmoc-Gly-OH.

Смолу CTC (500 г) загружают в реактор. Смола оставляют для набухания в DMF и перемешивают. Fmoc-Gly-OH вместе с DMF/DCM добавляют в реактор и загружают на 2 ч. Раствор сливают и промывают с использованием DMF. Дважды добавляют DMF/DIPEA/MeOH в реактор и сливают для копирования и каждый раз перемешивают в течение 20 мин. Смолу, загруженную Gly, далее промывают DMF. Определено, что загрузка составляет 1,2 ммоль/г.

Снятие Fmoc-защиты.

Для снятия защиты Fmoc используют два введения 20% пиперидина в DMF. Для каждого перемешивания применяют время реакции 80 мин, после чего реагенты для снятия защиты сливают и фильтруют. После завершения реакции снятия защиты промывают 6,5 объема DMF восемь раз при перемешивании в течение 5 мин. Хлораниловое испытание используют для подтверждения завершения снятия защиты.

Активация аминокислот.

Раствор Охума (2 экв., 1,25 моль/кг) добавляют в реактор предварительной активации, затем добавляют аминокислоту (2 экв.) вместе с дополнительным растворителем DMF для разбавления концентрации аминокислоты до 0,4 моль/кг. Затем в реактор добавляют раствор DIC (2,2 экв., 1,25 моль/кг) для начала активации. Время активации 2 ч применяется для Glu, в то время как для Aib и Туг используется перемешивание в течение 15 мин. Процесс активации поддерживают при 20°C.

Сочетание.

Активированный эфирный раствор переносят в реактор, который содержит пептид со снятой защитой на смоле. Для Glu и Aib применяется время перемешивания 8 ч, в то время как для соединения Туг потребуется 18 ч. Для подтверждения завершения реакции используют критерий Кайзера. После завершения сочетания раствор сливают и промывают 3×6,5 об. DMF для удаления остатков активированных эфиров.

Анализ чистоты.

Аналогичный аналитический способ мягкого отщепления вместе с СВЭЖХ-МС используют для определения пробы тетрамера TZP для периодического процесса. Определено, что чистота составляет 99,6%.

Таблица 26  
Материал для периодического производства, в котором используется масштаб  
600 ммоль для синтеза тетрамера TZP

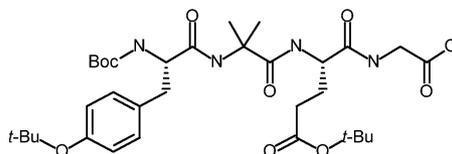
Стадия способа	Реагент/растворитель	Объем	Эквивалентность
Промывки после снятия Fmoc-защиты	20% (об./об.) пиперидина/DMF	2 x 6,5 мл/г смолы	
Промывки после снятия защиты	DMF	8 x 6,5 мл/г смолы	
Сочетание	Аминокислота		2
	Охума		2
	DIC		2,2
	DMF	Смола 8,36 мл/г	
Промывки после сочетания	DMF	3 x 6,5 мл/г смолы	

#### Сравнение способов.

Аналогичная чистота тетрамеров TZP получена при использовании технологии "последовательно расположенных реакторов" и периодического способа (99,3% и 99,6%, соответственно). Для способа с последовательно расположенными реакторами для получения тетрамера TZP используют всего 118,9 г материалов (растворители, реагенты, исключая смолу) на ммоль исходной смолы. В периодическом способе на ммоль исходной смолы наносят всего 218,8 г материалов (растворители, реагенты, исключая смолу). В целом, новые последовательно расположенные реакторы позволяют снизить PMI на 45,7% по сравнению с традиционными периодическими способами.

Пример конструирования тетрамера тирзепатида с использованием твердофазного пептидного синтеза (ТФСП) в N-бутилпирролидиноне/фурановом зеленом альтернативном растворителе.

При традиционном твердофазном синтезе пептидов используют значительное количество токсичных растворителей, таких как диметилформамид, N-метил-2-пирролидон, диметилацетамид и дихлорметан, что создает проблемы для промышленной гигиены и охраны окружающей среды. По этой причине существует большой интерес к разработке более экологически чистого альтернативного растворителя с преимуществами снижения PMI за счет последовательно расположенных реакторов для технологии ТФСП следующего поколения. Двойная система NBP/фураны (особенно предпочтительны тетрагидрофуран и 2-метилтетрагидрофуран) выбирали в качестве альтернативного зеленого растворителя благодаря превосходному набуханию смолы на основе полистирола, растворимости реагентов сопряжения и высокой эффективности реакций сопряжения и снятия защиты по результатам обширных предварительных исследований. В целях обратного сравнения с синтезом тетрамера TZP (терзепатида) с использованием растворителя DMF в предыдущем примере, для синтеза тетрамера тирзепатида применяют альтернативную систему "зеленых" растворителей NBP/THF:



Конструирование данного тетрамера с использованием способа последовательно расположенных реакторов описано в следующем тексте. Последовательность аминокислот представлена в табл. 27, причем 9-фторенилметилоксикарбонильная (Fmoc) группа защищает  $\alpha$ -азот глицина, глутаминовой кислоты и 2-аминоизомасляной кислоты, а т-бутилоксикарбонил (Boc) и трет-бутил (tBu) применяют для защиты  $\alpha$ -азота тирозина и кислорода глутаминовой кислоты соответственно. Отмечается, что смолу СТС с нагрузкой Fmoc-Gly-OH (нагрузка 0,85 ммоль/г), приготовленную при синтезе тетрамера TZP в примере с растворителем DMF, используют для примера с "зеленым" растворителем NBP/THF. Подробный способ загрузки можно найти в предыдущем примере. Аналогичный способ последовательно расположенных реакторов используют для создания оставшихся 3 аминокислот в системе растворителей NBP/THF на смоле СТС, как показано ниже.

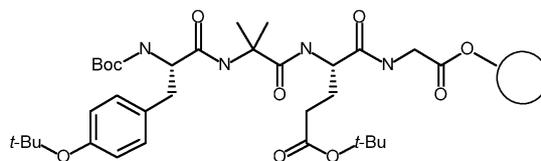


Таблица 27

Порядок 4 аминокислот, используемых в синтезе тетрамера тирзепатида посредством ТФСР

Порядок добавления аминокислоты (АА)	Положение АА на пептиде	Название АА	АА, используемая на стадии соединения
1	4	Глицин	Fmoc-Gly-OH
2	3	Глутаминовая кислота	Fmoc-Glu(tBu)-OH
3	2	2-аминоизомасляная кислота	Fmoc-Aib-OH
4	1	Тирозин	Woc-Tyr(tBu)-OH

Последовательно расположенные реакторы с альтернативным способом растворения NBP/фуранов. Подготовка сырья.

Готовят 20-процентный раствор пиперидина в NBP/THF следующим образом: разбавляют пиперидин (2,0 л) до объема 10,0 л посредством добавления NBP/THF (1,5:1 об./об.) с получением 20% раствора по объему.

Готовят 0,72 моль/кг раствора Охута в NBP/THF (2:1, об.:об.) следующим образом: растворяют этил(гидроксиимино)цианоацетат (Охута, 176,1 г) в NBP:THF (2:1, об.:об.) (1545,1 г) для получения 0,72 моль/кг раствора, затем через раствор пропускают азот при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят 0,72 моль/кг раствора DIC в NBP/THF (2:1, об.:об.) следующим образом: растворяют N,N'-5 диизопропилкарбодиимид (172,0 г) в NBP/THF (2:1, об.:об.) (1721,3 г) для получения 0,72 моль/кг раствора, затем через раствор пропускают азот при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят раствор 0,35 моль/кг глутаминовой кислоты в NBP/THF (2:1 об.:об.) следующим образом: растворяют Fmoc-Glu(tBu)-OH (175,8 г) в NBP/THF (2:1, об.:об.) (1004,5 г), встряхивают до растворения, а затем через раствор пропускают азот при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят 0,35 моль/кг раствора Fmoc-Aib-OH в NBP/THF (2:1, об.:об.) следующим образом: растворяют Fmoc-Aib-OH (139,4 г) в NBP/THF (2:1, об.:об.) (1045,9 г), встряхивают до растворения, а затем пропускают через раствор азот при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят раствор Woc-Tyr(tBu)-OH в NBP/THF (2:1, об.:об.) с концентрацией 0,40 моль/кг следующим образом: растворяют Woc-Tyr(tBu)-OH (139,4 г) в NBP/THF (2:1, об.:об.) (1040,9 г), встряхивают до растворения, а затем барботируют азотом через раствор при 2 стандартных кубических футах в час.

Готовят реакционную систему следующим образом: добавляют смолу CTC (108 г, 0,85 ммоль/г, 91,8 ммоль), поровну распределяя между реакторами "RB1", "RB2" и "RB3". Добавляют 350 мл NBP/THF (1,5:1, об.:об.) в каждый реактор и перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч при 20°C для набухания смолы.

Общая процедура А - процесс снятия защиты Fmoc и процесс промывки NBP/ТГФ.

Удаление защиты Fmoc проводят параллельно во всех трех реакторах, RB1, RB2 и RB3, при температуре 30°C в течение определенного периода времени и 20% растворе пиперидина в NBP/THF (1,5:1, об.:об.). Затем раствор сливают в емкость для отходов и добавляют дополнительный раствор пиперидина для снятия защиты, перемешивают до завершения реакции. Более конкретно, для 1<sup>-го</sup> перемешивания для снятия защиты Fmoc-Gly-OH, например, к RB1 добавляют раствор пиперидина (20 об.% в NBP/THF (1,5:1, об.:об., 209 г) и промывают линию переноса пиперидина 5 мл смеси растворителей NBP/THF(1,5:1, об.:об.) и начинают перемешивание. Аналогичным образом добавляют 208,8 г и 205 г 20 об.% раствора пиперидина в RB2 и RB3 и промывают линию пиперидина соответственно. Затем перемешивают три реактора в течение 45 мин при 30°C для параллельного снятия защиты и после этого раствор сливают. Отбирают пробы для онлайн-ЖХ-МС и качественно проверяют, равен ли нулю пик извлеченных ионов защищенного Fmoc тетрамера для подтверждения завершения реакции. Для полного снятия защиты с Fmoc-Gly-CTC в RB 1/2/3 применяют еще пять параллельных перемешиваний для снятия защиты. Аналогичную стратегию перемешивания для снятия защиты применяют для снятия защиты Glu 3 и Aib 4 с двумя перемешиваниями для снятия защиты, а в табл. 28 кратко изложена загрузка раствора пиперидина для всей сборки тетрамера TZP.

Смесь растворителей NBP/THF (1,5:1, об.:об.) используют для промывки после реакции при температуре 30°C с применением аналогичных стратегий "последовательно расположенных реакторов" и рециркуляции растворителей. Более конкретно, RB1/2/3 промывают десятью циклами промывки NBP/THF по всей конструкции тетрамера TZP. Используемый растворитель NBP/THF в рециркуляционном сосуде поровну делят на пять загрузок и добавляют в RB1/2/3 последовательно для первых пяти циклов промывки с 5-минутным перемешиванием в каждом. Все первые пять использованных растворителей NBP/THF выбрасываются в бак для отходов после использования. Для оставшихся 5 промывок свежий NBP/THF используют для RB 1/2/3 в серии промывок и собирают в сосуд для рециркуляции NBP/THF, подготовленный для следующей промывки аминокислоты после снятия защиты. Наконец, NBP/THF загружают в три реактора по 100 мл в каждом в качестве цикла очистки тележки для проб и далее собирают

ют в сосуд для рециркуляции. В табл. 29 кратко изложен массовый баланс для промывки после снятия защиты, а в табл. 30 приведены данные об остаточной концентрации пиперидина на протяжении всего синтеза, которая составляет менее 600 ppm для всех циклов.

Таблица 28  
Материал, используемый для снятия защиты при 30°C

№ цикла	Снятие защиты AA	Цикл снятия защиты	Время отст аивания (мин.)	Объемы растворов p/p			Использование пиперидина		NBP в 20% растворе P/p		THF в 20% растворе P/p	
				R В 1	R В 2	R В 3	г	г/ммоль	г	г/ммоль	г	г/ммоль
1	Gly 4	1	45	6,8	6,8	6,7	126,4	1,2	288,9	3,3	210,6	2,2
		2	45	6,7	6,9	6,9	127,2	1,2	288,9	3,3	210,6	2,2
		3	45	6,7	6,6	6,7	123,9	1,1	281,5	3,2	205,2	2,1
		4	120	7,0	6,9	6,8	128,3	1,2	291,4	3,3	212,4	2,2
		5	300	6,6	6,8	6,7	124,6	1,2	283,1	3,2	206,3	2,1
		6	120	7,0	7,0	6,9	129,5	1,2	294,1	3,3	214,4	2,2
2	Glu 3	1	90	6,4	6,5	6,5	120,4	1,1	273,6	3,1	199,4	2,1
		2	90	6,7	6,9	6,7	125,9	1,2	285,9	3,2	208,4	2,2
3	Aib 2	1	90	6,5	6,5	6,5	121,0	1,1	274,8	3,1	200,3	2,5
		2	90	6,8	6,7	6,5	123,7	1,1	280,9	3,2	204,8	2,1
	Всего			60,4	61,0	60,3	1127,1	10,4	2562,0	29,1	1867,5	21,9
	Среднее			6,0	6,1	6,0	112,7	1,0	256,2	2,9	186,8	2,2

Таблица 29  
Использование материала для промывки после снятия защиты

№ цикла	Снятие защиты AA	Промывка гес NBP/THF		Промывка NBP/THF		Очистка тележки для проб NBP/THF	
		г	г/ммоль	г	г/ммоль	г	г/ммоль
1	Gly 4	1551,4	16,9	1307,0	14,2	657,0	7,2
2	Glu 3	1460,4	16,1	1295,2	14,3	369,7	4,1
3	Aib 2	1387,8	15,4	1315,6	14,6	296,9	3,3
	Всего	4399,6	48,4	3917,8	43,1	1323,6	14,5
	Среднее	1466,5	16,1	1305,9	14,4	441,2	4,8

Таблица 30

Остаточная концентрация пиперидина для промывки после снятия защиты

Цикл синтеза	Снятие защиты с АА	№ промывки	PPM
1	Gly 4	9-я	Недоступно
1	Gly 4	10-я	Недоступно
1	Gly 4	Промывка для очистки пробы	416
2	Glu 3	9-я	499
2	Glu 3	10-я	нет данных
2	Glu 3	Промывка для очистки пробы	348
3	Aib 2	9-я	593
3	Aib 2	10-я	506
3	Aib 2	Промывка для очистки пробы	Недоступно

Общая процедура В - активация аминокислот и процесс связывания в NBP/THF.

Для активации и реакции связывания объемное соотношение NBP/THF доводят до 2:1 для обеспечения лучшей растворимости реагентов. Для примера соединения Fmoc-Glu(tBu)-ОН, раствор глутаминовой кислоты (0,35 моль/кг, 786,4 г), раствор Охута (0,72 моль/кг, 382,4 г) и раствор DIC (0,72 моль/кг, 420,6 г) добавляют в реактор RA с оболочкой и перемешивают в течение 70 мин при 30°C с образованием активированного раствора глутаминовой кислоты и переносят в RB1(531,9 г), RB2(529,7 г) и RB3(533,9 г) соответственно. Реакторы RB1, RB2 и RB3 перемешивают в течение 8 ч при температуре 30°C, после чего раствор сливают из всех трех реакторов в резервуар для отходов. В конце реакции завершения сочетания проверяют с использованием критерия Кайзера. Поскольку сочетание Glu не завершается после первой стадии связывания, дополнительно добавляют активированный раствор Fmoc-Glu(tBu)-ОН в пропорции 1,5 для обеспечения еще 19 ч сочетания до соответствия критерию Кайзера. Тем не менее в оставшемся соединении Aib 2 и Tyr 1 применяется только одна стадия соединения с временем перемешивания 8 и 18 ч соответственно. В табл. 31 приведены подробные сведения об использовании материалов в ходе сочетания.

Для промывки после связывания с использованием растворителя NBP/THF (1,5:1, об.:об.) применяют три цикла промывки для промывки RA, RB1, RB2 и RB3. Более конкретно, свежий растворитель NBP/THF загружают через распылительный клапан в RA, а затем последовательно в RB1, RB2 и RB3 три раза. Аналогичную процедуру очистки тележки для проб проводят в качестве промывки после снятия защиты. Все использованные растворители после сочетания выбрасываются в бак для отходов. Материалы, используемые для промывки NBP/THF после связывания, обобщены в табл. 32.

Таблица 31

Использование материалов для сочетания

№ цикла	Сочетание АА	Цикл сочетания	Время сочетания (ч.)	Время активации (мин.)	Экв. АА			Экв. Охута			Экв. DIC		
					R B1	R B2	R B3	R B1	R B2	R B3	R B1	R B2	R B3
1	Glu 3	1	8	68	3,01	3,00	3,02	3,01	3,00	3,02	3,46	3,44	3,46
		2	19	69	1,51	1,51	1,48	1,51	1,51	1,48	1,70	1,73	1,70
2	Aib 2	1	8	35	3,04	3,04	3,07	3,04	3,04	3,07	3,50	3,49	3,52
3	Tyr 1	1	18	35	3,06	3,06	3,01	3,06	3,06	3,06	3,01	3,51	3,45
	Всего				10,6	10,6	10,6	10,6	10,6	10,6	11,7	12,2	12,1
	Среднее				3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,9	4,1	4,0

Таблица 32

## Использование материалов для промывки после сочетания

№ цикла	Сочетание AA	Цикл сочетания	Средний объем промывки NBP/THF			Применение промывки NBP/THF		Очистка тележки для проб NBP/THF	
			RB1	RB2	RB3	г	г/ммоль	г	г/ммоль
1	Glu 3	1	10,7	10,7	10,7	992,1	10,8	391,7	4,3
		2	10,6	10,6	10,6	985,3	10,7	297,0	3,2
2	Aib 2	1	10,9	10,9	10,9	1013,8	11,1	278,7	3,1
		1	10,4	10,4	10,4	971,6	10,8	357,0	4,0
	Всего		42,6	42,6	42,6	3962,7	43,5	1324,5	14,5
	Среднее		14,2	14,2	14,2	1320,9	14,5	441,5	4,8

Краткое изложение результатов.

Смолю промывают метиленхлоридом и сушат после сочетания Вос-Тур 1. Затем образец мягко отщепляют с использованием 30% гексафтор-2-пропанола/метиленхлорида (об./об.) и выделяют для анализа СВЭЖХ-МС. Полученная чистота тетрамера TZP для RB1, RB2 и RB3 составляет 92,19%, 94,64% и 98,04% соответственно. Основной примесью является добавка глутаминовой кислоты. Это в основном связано со стратегией связывания двойной глутаминовой кислоты, примененной в примере. Отмечено, что проблемы, связанные со снятием защиты Gly 4 и связыванием Glu 3, могут быть смягчены за счет более длительного времени набухания смолы (более 8 ч) перед снятием защиты Fmoc-Gly-CTC. Например, чистота тетрамера TZP 99,6% достигается при набухании смолы в течение 12 ч с использованием зеленого растворителя NBP/2-MeTHF (1,5; 1, об.:об.) в масштабе 1 ммоль. По этой причине значительное улучшение чистоты пептида может быть достигнуто с использованием зеленого растворителя NBP/фураны и технологии последовательно расположенных реакторов при более оптимальных условиях процесса. Для способа последовательно расположенных реакторов с использованием "зеленого" растворителя NBP/THF для получения тетрамера TZP используют всего 252,71 г материалов (растворители, реагенты, исключая смолу) на ммоль исходной смолы. В обычном периодическом способе с DMF используют 218,8 г/ммоль, а в последовательно расположенных реакторах с DMF используют 118,9 ммоль. Процедура с NBP/THF была новой и не оптимизированной, и в ней использовалось большее количество растворителя, чем в процедуре с DMF. Тем не менее, последовательно расположенные реакторы по-прежнему используют меньше растворителя по сравнению с одинарным реактором периодического действия для любой системы растворителей.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ связывания аминокислоты "X" с защищенной N-группой, присоединенной к смоле для пептидного синтеза, включающий:

получение первого реактора и второго реактора, причем каждый из первого реактора и второго реактора содержит некоторое количество защищенной N-группы, присоединенной к смоле для синтеза пептидов;

добавление первого количества реагента для снятия защиты в первый реактор;

удаление первого количества реагента для снятия защиты из первого реактора добавление первого количества реагента для снятия защиты во второй реактор;

добавление второго количества реагента для снятия защиты в первый реактор;

удаление первого количества реагента для снятия защиты из второго реактора;

удаление второго количества реагента для снятия защиты из первого реактора;

добавление второго количества реагента для снятия защиты во второй реактор;

удаление второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора;

промывка растворителем смолы для пептидного синтеза как в первом, так и во втором реакторах;

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" в первый реактор;

удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора;

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" во второй реактор;

добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" в первый реактор;

удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора;

удаление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора

добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" во второй реактор;

удаление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора; а также

промывка растворителем смолы для пептидного синтеза как в первом, так и во втором реакторах.

2. Способ по п.1, в котором аминокислота "X", которая содержится в первом и втором количествах активированного эфира аминокислоты "X", сама имеет защищенную N-группу.

3. Способ по п.1, дополнительно включающий  
добавление первого количества реагента для снятия защиты в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления первого количества реагента для снятия защиты из второго реактора, при этом третий реактор содержит некоторое количество защищенной N-группы, присоединенной к смоле для пептидного синтеза; а также  
добавление второго количества реагента для снятия защиты в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора.
4. Способ по п.3, дополнительно включающий следующее:  
добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора; а также  
добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" в третий реактор, при этом данное добавление происходит после удаления второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора.
5. Способ по п.4, дополнительно включающий  
добавление третьего количества реагента для снятия защиты в первый реактор, при этом данное третье количество реагента для снятия защиты добавляют в первый реактор после того, как второе количество реагента для снятия защиты было удалено из первого реактора; а также  
перенос третьего количества реагента для снятия защиты из первого реактора во второй реактор, причем данный перенос происходит после удаления второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора; а также  
перенос третьего количества реагента для снятия защиты из второго реактора в третий реактор; а также  
удаление третьего количества реагента для снятия защиты из третьего реактора.
6. Способ по п.5, дополнительно включающий  
добавление третьего количества активированного эфира аминокислоты "X" в первый реактор, при этом данное добавление происходит после удаления второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора;  
перенос третьего количества активированного эфира аминокислоты "X" во второй реактор, причем данный перенос происходит после удаления второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора;  
перенос третьего количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора в третий реактор; а также  
удаление третьего количества активированного эфира аминокислоты "X" из третьего реактора.
7. Способ по п.6, дополнительно включающий  
удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из третьего реактора; а также  
добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" обратно в первый реактор.
8. Способ по п.7, дополнительно включающий  
удаление первого количества реагента для снятия защиты из третьего реактора; а также  
добавление первого количества реагента для снятия защиты обратно в первый реактор.
9. Способ по п.1, в котором промывание первого и второго реакторов растворителем происходит посредством добавления растворителя в реакторы.
10. Способ по п.2, в котором после удаления второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора способ дополнительно включает:  
добавление первого дополнительного количества реагента для снятия защиты в первый реактор;  
перенос первого дополнительного количества реагента для снятия защиты из первого реактора во второй реактор;  
добавление второго дополнительного количества реагента для снятия защиты в первый реактор;  
удаление первого дополнительного количества реагента для снятия защиты из второго реактора;  
перенос второго дополнительного количества реагента для снятия защиты из первого реактора во второй реактор;  
удаление второго дополнительного количества реагента для снятия защиты из второго реактора.
11. Способ по п.10, причем способ после удаления второго дополнительного количества реагента для снятия защиты из первого реактора дополнительно включает:  
добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "Z" в первый реактор;  
перенос первого количества активированного эфира аминокислоты "Z" во второй реактор;  
добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "Z" в первый реактор;  
удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "Z" из второго реактора;  
перенос второго количества активированного эфира аминокислоты "Z" из первого реактора во вто-

рой реактор; а также

удаление второго количества активированного эфира аминокислоты "Z" из второго реактора.

12. Способ по п.11, дополнительно включающий следующее:

добавление первого дополнительного количества реагента для снятия защиты в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления первого дополнительного количества реагента для снятия защиты из второго реактора, при этом третий реактор содержит некоторое количество защищенной N-группы активированного эфира аминокислоты "X"; а также

добавление второго дополнительного количества реагента для снятия защиты в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора.

13. Способ по п.12, дополнительно включающий следующее:

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "Z" в третий реактор, где это добавление происходит после удаления первого количества аминокислоты "Z" из второго реактора; а также

добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "Z" в третий реактор, при этом данное добавление происходит после удаления второго количества активированного эфира аминокислоты "Z" из второго реактора.

14. Способ по п.1, в котором смола для синтеза пептидов в первом и втором реакторах представляет собой смолы Зибера или Ринка.

15. Способ по п.1, в котором смола для синтеза пептидов в первом и втором реакторах представляет собой смолы Ванга или смолы хлортритилхлорида.

16. Способ по п.1, в котором количество добавляемой аминокислоты X составляет от 1,1 до 1,6 эквивалентов.

17. Способ связывания аминокислоты "X" с защищенной N-группой, присоединенной к смоле для пептидного синтеза, находящейся в первом реакторе и втором реакторе, включающий:

добавление первого количества реагента для снятия защиты в первый реактор;

удаление первого количества реагента для снятия защиты из первого реактора добавление первого количества реагента для снятия защиты во второй реактор;

добавление второго количества реагента для снятия защиты в первый реактор;

удаление первого количества реагента для снятия защиты из второго реактора;

удаление второго количества реагента для снятия защиты из первого реактора добавление второго количества реагента для снятия защиты во второй реактор;

удаление второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора;

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" в первый реактор;

удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора;

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" во второй реактор;

добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" в первый реактор;

удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора;

удаление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора;

добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" во второй реактор; а также

также

удаление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора.

18. Способ по п.17, в котором аминокислота "X", которая содержится в первом и втором количествах активированного эфира аминокислоты "X", сама имеет защищенную N-группу.

19. Способ по п.17 или 18, дополнительно включающий

добавление первого количества реагента для снятия защиты в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления первого количества реагента для снятия защиты из второго реактора, при этом третий реактор содержит некоторое количество защищенной N-группы, присоединенной к смоле для пептидного синтеза;

удаление первого количества реагента для снятия защиты из третьего реактора;

добавление второго количества реагента для снятия защиты в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора;

добавление третьего количества реагента для снятия защиты в первый реактор, при этом данное третье количество реагента для снятия защиты добавляют в первый реактор после того, как второе количество реагента для снятия защиты было удалено из первого реактора; а также

перенос третьего количества реагента для снятия защиты из первого реактора во второй реактор, причем данный перенос происходит после удаления второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора;

перенос третьего количества реагента для снятия защиты из второго реактора в третий реактор;

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора.

кислоты "X" из второго реактора;

удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из третьего реактора;

добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из третьего реактора; а также

удаление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из третьего реактора.

20. Способ по п.19, дополнительно включающий

добавление третьего количества активированного эфира аминокислоты "X" в первый реактор, при этом данное добавление происходит после удаления второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора;

перенос третьего количества активированного эфира аминокислоты "X" во второй реактор, причем данный перенос происходит после удаления второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора;

перенос третьего количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора в третий реактор;

удаление третьего количества активированного эфира аминокислоты "X" из третьего реактора;

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" обратно в первый реактор, причем данное добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" происходит после удаления первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из третьего реактора.

21. Способ связывания аминокислоты "X" с защищенной N-группой, присоединенной к смоле для пептидного синтеза, включающий:

получение первого реактора и второго реактора, причем каждый из первого реактора и второго реактора содержит некоторое количество N-группы со снятой защитой, присоединенной к смоле для синтеза пептидов;

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" в первый реактор;

удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора;

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" во второй реактор,

добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" в первый реактор;

удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора;

удаление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из первого реактора;

добавление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" во второй реактор; а также

удаление второго количества активированного эфира аминокислоты "X" из второго реактора.

22. Способ по п.21, дополнительно включающий промывку первого реактора и второго реактора растворителем.

23. Способ по п.20 или 21, дополнительно включающий:

добавление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления первого количества аминокислоты "X" из второго реактора, при этом третий реактор содержит некоторое количество защищенной N- группы, присоединенной к смоле для пептидного синтеза;

удаление первого количества активированного эфира аминокислоты "X" из третьего реактора; и

добавление второго количества аминокислоты "X" в третий реактор.

24. Способ по п.23, дополнительно включающий

добавление третьего количества аминокислоты "X" в первый реактор, причем данное третье количество аминокислоты "X" добавляют в первый реактор после того, как второе количество аминокислоты "X" было удалено из первого реактора; а также

перенос третьего количества аминокислоты "X" из первого реактора во второй реактор, причем данный перенос происходит после удаления второго количества аминокислоты "X" из второго реактора.

25. Способ по п.24, дополнительно включающий

удаление второго количества аминокислоты "X" из третьего реактора;

перенос третьего количества аминокислоты "X" из второго реактора в третий реактор;

удаление третьего количества аминокислоты "X" из третьего реактора; а также

добавление первого количества аминокислоты "X" обратно в первый реактор, при этом первое количество аминокислоты "X" добавляют обратно в первый реактор после удаления первого количества реагента для снятия защиты аминокислоты "X" из третьего реактора.

26. Способ снятия защиты с защищенной N-группы, присоединенной к смоле для пептидного синтеза, включающий

получение первого реактора и второго реактора, причем каждый из первого реактора и второго реактора содержит некоторое количество защищенной N-группы, присоединенной к смоле для синтеза пептидов;

добавление первого количества реагента для снятия защиты в первый реактор;

удаление первого количества реагента для снятия защиты из первого реактора;

добавление первого количества реагента для снятия защиты во второй реактор;  
добавление второго количества реагента для снятия защиты в первый реактор;  
удаление первого количества реагента для снятия защиты из второго реактора;  
удаление второго количества реагента для снятия защиты из первого реактора;  
добавление второго количества реагента для снятия защиты во второй реактор; а также  
удаление второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора.

27. Способ по п.26, дополнительно включающий промывку первого реактора и второго реактора растворителем.

28. Способ по п.26 или 27, дополнительно включающий:

добавление первого количества реагента для снятия защиты в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления первого количества реагента для снятия защиты из второго реактора, при этом третий реактор содержит некоторое количество защищенной N-группы, присоединенной к смоле для пептидного синтеза;

удаление первого количества реагента для снятия защиты из третьего реактора; а также

добавление второго количества реагента для снятия защиты в третий реактор, причем данное добавление происходит после удаления второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора.

29. Способ по п.28, дополнительно включающий:

добавление третьего количества реагента для снятия защиты в первый реактор, при этом данное третье количество реагента для снятия защиты добавляют в первый реактор после того, как второе количество реагента для снятия защиты было удалено из первого реактора; а также

перенос третьего количества реагента для снятия защиты из первого реактора во второй реактор, причем данный перенос происходит после удаления второго количества реагента для снятия защиты из второго реактора.

30. Способ по п.29, дополнительно включающий

удаление второго количества реагента для снятия защиты из третьего реактора;

перенос третьего количества реагента для снятия защиты из второго реактора в третий реактор;

удаление третьего количества реагента для снятия защиты из третьего реактора; а также

добавление первого количества реагента для снятия защиты обратно в первый реактор, при этом первое количество реагента для снятия защиты добавляют обратно в первый реактор после удаления первого количества реагента для снятия защиты из третьего реактора.

31. Способ по п.9, в котором многократные циклы промывки проводят между добавлениями каждой конкретной аминокислоты.

32. Способ по п.31, в котором растворитель для промывки после каждого цикла промывки собирают в емкость для повторного использования, и затем этот использованный растворитель для промывки применяют в следующем цикле промывки.

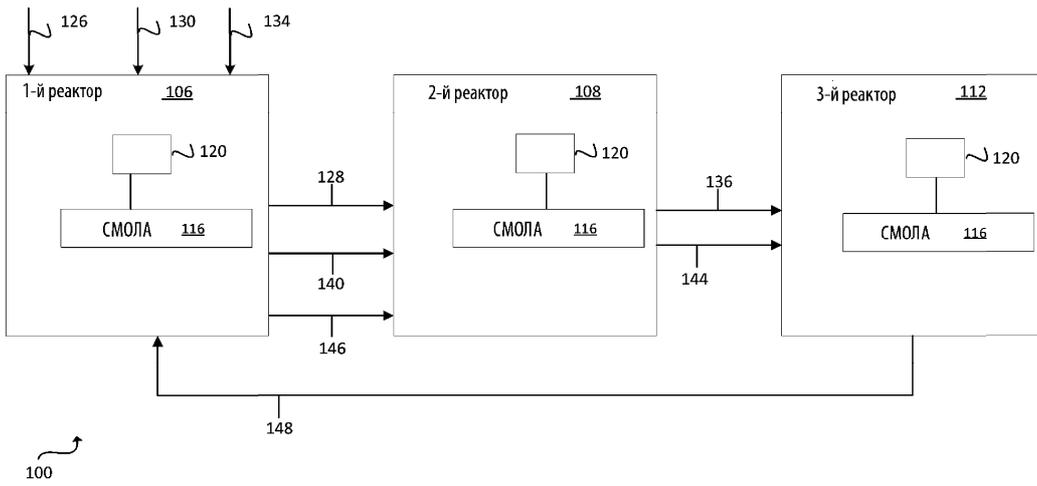
33. Способ по п.32, в котором использованный растворитель для промывки применяют в первой половине последующих циклов промывки.

34. Способ по п.9, в котором растворитель является экологически безопасным или "зеленым" растворителем.

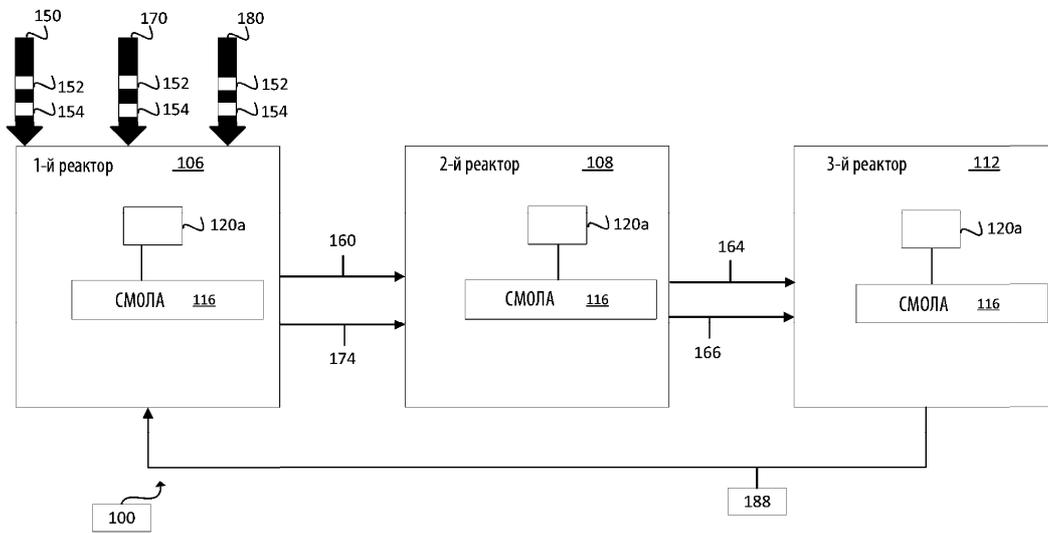
35. Способ по п.34, в котором экологически безопасный или "зеленый" растворитель представляет собой ацетонитрил, этилацетат, изопропил ацетат, 2-метилтетрагидрофуран, циклопентилметиловый эфир или N-бутилпирролидон или их смеси.

36. Способ по п.9, в котором растворитель представляет собой смесь N-бутилпирролидона и тетрагидрофурана.

37. Способ по п.9, в котором растворитель представляет собой смесь N-бутилпирролидона и 2-метилтетрагидрофурана.



Фиг. 1



Фиг. 2



