

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Proteinen

Neue analytische
Methoden (29)

Von Gerhard Seipke*, Hubert Müllner und Ulrich Grau

In den letzten Jahren hat die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) von Proteinen einen geradezu dramatischen Aufschwung genommen. Sie ergänzt heute mit einer Vielzahl von Varianten das dem Proteinchemiker zur Verfügung stehende Repertoire an leistungsfähigen Trennmethoden, bei dem auf dem analytischen Sektor vorher elektrophoretische Verfahren dominierten. Zudem beschert die Gentechnik der Proteinbiochemie gegenwärtig eine Renaissance. Dabei sind neue analytische und präparative Trennprobleme aufgetaucht, zu deren Lösung sich HPLC-Verfahren ideal eignen. Die HPLC ist längst keine reine Laboratoriumsmethode mehr, es werden inzwischen auch technische HPLC-Systeme zur Trennung von Proteinen – vor allem solchen von hohem pharmazeutischem Interesse – im 100g-Maßstab entwickelt. An zwei Beispielen aus der pharmazeutisch-chemischen Praxis – Insulin und Interleukin 2 – soll die Anwendungsbreite der analytischen und präparativen HPLC demonstriert werden.

1. Einleitung

Seit ihrer Entdeckung vor mehr als achtzig Jahren hat die Flüssigkeitschromatographie eine zentrale Stellung unter den Trennmethoden der Biochemie eingenommen. Eine differenzierte Verteilung von Biopolymeren zwischen einer stationären und einer mobilen Phase lässt sich erzielen, indem Unterschiede in der Molekülgröße, den ionicen Eigenschaften, der Löslichkeit, dem polaren oder unpolaren Charakter, aber auch den spezifischen Wechselwirkungen mit anderen Molekülen (z. B. Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen) ausgenutzt werden. Die Füllmaterialien ließen früher aber keine schnellen, hochauflösenden Trennungen zu, so daß diese Verfahren überwiegend bei niedrigem Druck präparativ genutzt wurden. Auf dem analytischen Sektor dominierten Elektrophoresemethoden.

Für eine hochauflösende Chromatographie benötigt man eine mikropartikuläre Säulenfüllung geringer Korngrößenverteilung^[1,2]. Zwar wußte man dies schon recht früh, doch dauerte die Umsetzung dieser Überlegung in die Praxis Jahrzehnte, da etliche technische Probleme zu lösen waren:

- Entwicklung von Pumpensystemen, die bei hohen Drücken konstante Flußgeschwindigkeiten garantieren.
- Ersatz der bisher verwendeten „weichen“ Gele durch druckstabile Materialien.
- Reproduzierbare und gleichmäßige Packung von Säulen mit diesen Feinpakten.

Nachdem die apparativen Voraussetzungen erfüllt waren, fand die HPLC in einer beeindruckend rasanten Entwicklung Anwendung in der Biochemie. Dem Proteinchemiker wurde damit innerhalb weniger Jahre eine breite Palette neuer Trennverfahren an die Hand gegeben. Die Anwendungsmöglichkeiten der HPLC (Tabelle 1) beschränken sich aber nicht nur auf die Analytik. Zunehmend werden die neuen Techniken auch präparativ – im Laboratorium wie in der industriellen Produktion – genutzt.

Tabelle 1. Einige Anwendungen der HPLC in der Peptid- und Proteinchemie.

Analytik

- Aminosäureanalyse
- Reinheitsprüfung synthetischer Peptide, Reaktionsoptimierung
- Identifizierung multipler Proteinformen und Mutanten
- Molekulargewichtsbestimmungen
- Strukturanalyse durch Fragmentierung („Peptide Mapping“)
- Sequenzanalyse (Identifizierung der Abbaustufen)
- Chemische oder enzymatische Modifizierung (Reaktionsoptimierung, Produktcharakterisierung)
- Ermittlung von Enzymspezifitäten
- Metabolismusstudien, Prohormidentifizierung

Präparative Trennungen

- Isolierung von Naturstoffen aus Extrakten
- Reinigung synthetischer oder gentechnologischer Peptide und Proteine
- Reinigung modifizierter Peptide und Proteine, speziell radioaktiv markierter Substanzen
- Trennung von diastereomeren Peptiden
- Isolierung von Proteinfragmenten für die Sequenzanalyse

2. Aufbau und Betrieb einer HPLC-Anlage

Die HPLC ist per se keine neue Methode, sondern die Perfektionierung bekannter Techniken in Verbindung mit einem erhöhten apparativen Aufwand. Die erfolgreiche Anwendung der HPLC als quantitative Analysenmethode setzt eine sorgfältige Auswahl und hohe Reinheit der Lösungsmittel, eine hohe Flußkonstanz und eine ständige Überprüfung der Säulenleistung voraus.

Eine typische HPLC-Anlage (Abb. 1) besteht aus einem Hochdruckpumpensystem, einem Probenaufgabeteil (Injektor und Vorsäule), einer Säule und einem Detektor. Die Integration eines Fraktionssammlers und/oder eines aufwendigeren Zentralrechners für die Datenverarbeitung ist möglich. Soll das Gerät für Routineanalysen oder präparative Zwecke benutzt werden, ist diese Automatisierung sinnvoll.

2.1. Pumpen

Mit allen heute auf dem Markt befindlichen HPLC-Pumpen^[3] können sowohl organische Lösungsmittel als auch wässrige Pufferlösungen präzise gefördert werden.

[*] Dr. G. Seipke, Dr. H. Müllner, Dr. U. Grau
Pharma Forschung Biochemie der Hoechst AG
Postfach 8003 20, D-6230 Frankfurt am Main 80

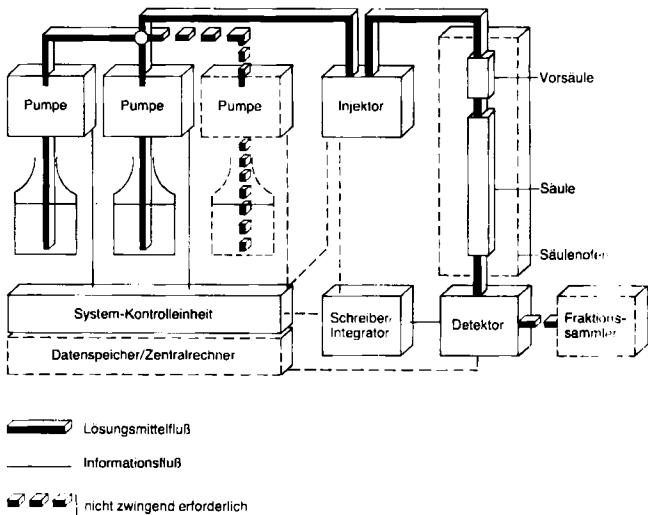


Abb. 1. Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage.

Die Pumpen müssen einen konstanten und pulsationsarmen Flüssigkeitsstrom aufrechterhalten. Diese Bedingung wird in idealer Weise von den einer überdimensionalen Spritze ähnelnden Langhub-Kolbenpumpen erfüllt, deren Fluß pulsationsfrei und nahezu unabhängig vom Gegendruck der Säule und der Viskosität des Lösungsmittels ist. Durch ihr Design mit fixiertem, relativ großem internen Volumen ist ihre Anwendbarkeit begrenzt.

Überwiegend werden Försysteme auf der Basis von Kurzhub-Kolbenpumpen oder Membran-Kolbenpumpen eingesetzt. Mit erheblichem elektronischen Aufwand wird für die Einhaltung der eingestellten Förderleistung auch bei wechselndem Gegendruck (veränderte Kompressibilität) gesorgt. Durch optimierte Pumpenmechanik wird die Pulsation reduziert, die durch die Kolbenbewegung entsteht. Weiteres Glätten der Restpulsion erfolgt üblicherweise durch hydraulische Dämpfung.

2.2. Gradientenformer

Die Zusammensetzung der mobilen Phase kann durch Mischen von zwei oder mehr Lösungsmitteln während der Analyse kontinuierlich geändert werden (Gradientenelution). Diese Technik wird bei der Trennung von Proteinen mit adsorptiven Chromatographieverfahren überwiegend eingesetzt. Die Gradientenelution führt zu gleichmäßig scharfen Peaks über das gesamte Elutionsdiagramm. Im Gegensatz zur isokratischen Elution, bei der das Lösungsmittel während der gesamten Elution unverändert bleibt, wird bei der Gradientenelution auch für stark retardierte Komponenten die gleiche Nachweisempfindlichkeit erreicht und die Analysenzeit verkürzt^[4]. Proteine binden über mehr als eine Kontaktstelle kooperativ an die stationäre Phase^[5-7]. Nur durch das Zusammenwirken entsprechend vieler Moleküle des „Verdrängungsgens“ (Salz in der Ionen austauschchromatographie, organisches Lösungsmittel bei der Umkehrphasenchromatographie usw.) werden sie wieder abgelöst. Daraus lässt sich eine mit steigendem Molekulargewicht zunehmend konkav verlaufende Abhängigkeit der Retention von der Eluenszusammensetzung ableiten^[4, 8, 9]. In der Praxis bedeutet dies, daß bei langsamer Steigerung der Verdrängerkonzentration zu-

nächst eine extrem starke Adsorption und nur eine minimale Wanderung der Proteine stattfindet; bei weiterer Steigerung folgt eine drastische Abnahme der Adsorption (und damit Retention) in einem mit wachsendem Molekulargewicht zunehmend engeren Bereich, dessen Lage von Protein zu Protein außerordentlich stark differieren kann^[7-10]. Gradientensysteme sind deshalb für die Trennung komplexer Proteingemische unverzichtbar, doch müssen hohe Anforderungen an die Präzision derartiger Systeme gestellt werden.

Überwiegend werden die Lösungsmittel mit zwei getrennt regelbaren Pumpen gemischt. Bei den meisten Anwendungen sind binäre Gradienten ausreichend. Ein dritter Laufmittelstrom kann nützlich sein zur Aufgabe größerer Probenvolumina bei präparativen Arbeiten oder zum Zumischen eines weiteren, stärker eluierenden Lösungsmittels am Ende einer Trennung durch Umkehrphasenchromatographie^[11].

2.3. Eluentien

Die Wahl der Eluentien hängt in erster Linie vom gewählten Trennprinzip ab (siehe Abschnitt 3); zusätzlich sind Grenzen durch die Kompatibilität mit der stationären Phase (siehe Abschnitt 2.5) und den Materialien der HPLC-Anlage gesetzt. Vor halogenidhaltigen Puffern wird oft gewarnt. In der Praxis lässt sich die Korrosion von Pumpen und Säulen jedoch vermeiden^[12]. Die Auswahl von Puffersubstanzen oder organischen Lösungsmitteln richtet sich weiterhin nach dem Detektionsprinzip und den Anforderungen an die Nachweisempfindlichkeit (siehe Abschnitt 2.6). Zu beachten ist außerdem die Viskosität, die nicht nur den entstehenden Gegendruck des Systems, sondern auch die Trennleistung einer Säule (gemessen als Bodenzahl $N^{[2, 13]}$) mit bestimmt.

Filtration aller Eluentien über ein $0.2 \mu\text{m}$ - oder $0.45 \mu\text{m}$ -Membranfilter schont nicht nur die Pumpen, sondern erhöht auch die Lebensdauer der Trennsäulen. Danach erfolgt gründliches Entgasen, da gelöster Sauerstoff eine empfindliche UV-Detektion bei niedrigen Wellenlängen unmöglich macht und zu Problemen beim Mischen von Solventien (Luftblasenbildung) führen kann. Einleiten von Helium ist sehr effektiv, ohne die Zusammensetzung der mobilen Phase wesentlich zu ändern^[14]. Bei Pumpentypen, die gegen gelöstes Helium empfindlich sind, kann Vakuum- oder Ultraschall-Entgasen vorteilhaft sein.

2.4. Probenaufgabe

Die Analyse komplexer Proteingemische und das Äquilibrieren der Säulen nach Gradientenelution dauern relativ lang. Eine automatische Injektion der Proben ermöglicht eine optimale Auslastung der teuren Anlagen; wie bei manuellem Betrieb hat man die Wahl zwischen einem fixierten Probenvolumen (Probenschleifen) oder einer frei wählbaren Dosierung (Spritze).

2.5. Säulen

Die Chromatographiesäule ist das Herz jeder HPLC-Anlage. Durch das Design ist sie ebenso wie durch die Art

und Qualität der Füllung entscheidend für eine gute Auflösung und minimale Dispersion der Probenkomponenten. Im allgemeinen werden Stahlsäulen mit festen, auf minimale Totvolumina optimierten Endstücken eingesetzt. Daneben sind preisgünstigere Kartuschenhydrate erhältlich, bei denen fertig gepackte Austauschpatronen in eine Halterung eingespannt werden. Radial komprimierbare Kunststoffpatronen bieten dabei den zusätzlichen Vorteil, daß Wandeffekte^[15] vermieden werden und ein Neupacken nach Rißbildung möglich ist.

Die meisten Stahlsäulen für analytische Trennungen haben einen Durchmesser von 4.0–4.6 mm und eine Länge von 10–30 cm. Bei der Gelfiltration sind manchmal längere, bei den adsorptiven Techniken auch wesentlich kürzere Säulen erfolgreich eingesetzt worden^[16–19]. Das Auflösungsvermögen einer Säule wird in der Tat von ihrer Länge nicht sehr stark beeinflußt (proportional zu $N^{0.5}$ ^[4]). Aus dem speziellen Elutionsverhalten der Makromoleküle (siehe Abschnitt 2.2) und einfachen Modelltrennungen kann jedoch nicht der Schluß gezogen werden, daß lange Säulen für Proteintrennungen mit Gradientenelution generell kaum Vorteile brächten^[20]. In Einklang mit der Gradiententheorie von Snyder et al.^[4] trifft dies nur zu, wenn kurze Elutionszeiten (steile Gradienten) gewählt werden können. Erfordern schwierige Trennprobleme jedoch längere Elutionszeiten (flache Gradienten), so nimmt der Einfluß der Säulenlänge auf die Leistungsfähigkeit des Systems drastisch zu^[2,22]. Wenn Kurzsäulen einsetzbar sind, haben sie den Vorzug des niedrigeren Gegendrucks (höhere Langzeitstabilität) und einer geringeren Verdünnung der Probe.

Der Säulendurchmesser hat theoretisch keinen Einfluß auf die Trennleistung einer Säule, wenn die Durchflußgeschwindigkeit entsprechend angepaßt wird^[21]. Da zudem die Wandeffekte^[15] bei größerem Durchmesser weniger zum Tragen kommen, liegt hier ein großes Potential zur Steigerung der Beladungskapazität für präparatives Arbeiten. Verringerung des Durchmessers führt zu kleineren Peakvolumina und damit zu niedrigeren Nachweisgrenzen^[21]; diese sogenannte „micro-bore“-Technik (Säulendurchmesser < 1 mm) wird für Proteine bisher nur vereinzelt angewendet^[23,24] und erfordert wie die erwähnten Kurzsäulen erhöhte Sorgfalt bezüglich einer möglichen Peakverbreiterung durch die übrigen Systemkomponenten. Entsprechende Fertigsäulen sind nur mit Füllmaterialien geringen Poren durchmessers (ca. 100 Å) erhältlich, die für Proteine mit Molekulargewichten über 20 000 weniger geeignet sind als weitporige Partikel (> 300 Å)^[25–27].

Hinsichtlich der Korngröße der Füllung ist ein Komromiß zu schließen zwischen möglichst hoher Auflösung, die mit abnehmender Korngröße besser wird, und Langzeitstabilität der Säulenfüllung. Für höhermolekulare biologische Proben und bei Verwendung großporiger Partikel ist ein Partikeldurchmesser von 5 µm derzeit der untere Grenzwert^[21].

Kieselgel erfüllt die wichtigsten Kriterien weitgehend: kleinste Partikel, hohe mechanische Festigkeit bei hoher Porosität. Es ist aber nur bei pH-Werten zwischen 2 und 7 stabil. Organische Polymere sind hingegen auch für basische Puffer geeignet, aber bisher noch nicht mit ähnlicher Feinkörnigkeit und Druckstabilität herstellbar. Eine leicht austauschbare Vorsäule ist unbedingt zu empfehlen, wenn

mit komplexen Gemischen wie Zellhomogenisaten gearbeitet wird. Filtrationen oder irreversible Adsorptionen finden hier statt, und die Hauptsäule wird geschont.

Viele Proteintrennungen lassen sich bei Raumtemperatur durchführen. Die Temperatur beeinflußt aber Auflösung, Retention und Wiedergewinnung bei allen adsorptiven Techniken^[28–30].

Meistens wird man sich kommerziell erhältlicher, fertig gepackter Säulen bedienen, die mit Testdiagrammen geliefert werden. Selten werden jedoch Säulen, die speziell für Proteintrennungen angeboten werden, von den Herstellern auch mit entsprechenden Probegemischen und unter relevanten Elutionsbedingungen getestet. In der Praxis wird sich daher jeder Anwender für sein Spezialproblem selbst einen Eindruck von der Güte der Säulenpackung, der Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems und insbesondere der Wiedergewinnungsrate von Proteinen verschaffen müssen. Dafür werden verschiedene Modellgemische vorgeschlagen^[31].

2.6. Detektoren

UV-Detektoren werden für Proteintrennungen mit Abstand am häufigsten eingesetzt^[32]. Bei $\lambda = 210$ –230 nm absorbiert die Peptidbindung, wobei die Extinktion von der Aminosäurezusammensetzung unabhängig ist^[33]. Bei $\lambda = 215$ nm ist auch die Sekundärstruktur^[34] ohne Einfluß. Die Empfindlichkeit ist 10–20fach höher als bei $\lambda = 250$ –280 nm, wo nur die aromatischen Aminosäuren absorbieren. Detektoren, die bei niedrigen Wellenlängen arbeiten, stellen aber auch höhere Anforderungen an Art und Reinheit der Lösungsmittel und verlangen weitgehenden Ausschuß von Sauerstoff. Bei Gradientenelution ist ein Drift der Basislinie kaum vermeidbar. Programmierbare Detektoren (z. B. Diodenarrays) können zu verschiedenen Zeiten – im allgemeinen in den Peakmaxima – in sehr kurzer Zeit den gesamten verfügbaren Wellenlängenbereich abfahren. Dies kann vor allem bei der Analyse kürzerer Peptide (z. B. aus enzymatischem oder chemischem Abbau) hilfreich sein^[35–37].

Die Eigenfluoreszenz (Tryptophan) ist nur in speziellen Fällen, z. B. zur Identifizierung von Peptiden mit vielen aromatischen Aminosäuren, hinreichend empfindlich^[38]. Universeller einsetzbar ist die Fluoreszenzdetektion in Verbindung mit einer unmittelbaren Nach-Säulen-Derivatisierung^[39]. Mit o-Phthalaldehyd^[40] oder Fluorescamin^[41] entstehen Derivate, die bei höheren Wellenlängen anregbar sind und damit auch einen störungsfreien Nachweis in Gegenwart stark UV-absorbierender Puffer ermöglichen. Bei präparativen Anwendungen wird mit Hilfe von Schaltventilen ein kleiner Teil für die Detektion abgezweigt (Split-Technik). Auch eine Cystein-spezifische Methode wurde beschrieben^[42].

3. Trennprinzipien

3.1. Gelfiltration

Die Gelfiltration nimmt innerhalb der HPLC-Methoden eine Sonderstellung ein: Die Trennung erfolgt nicht aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Probe, stationärer Phase und Fließmittel, sondern es wird lediglich nach Molekülgröße sortiert. Proteine werden bei idealer Gelfiltration

tion aufgrund der Verteilung zwischen mobiler Phase im Partikelzwischenraum einerseits und in den Matrixporen andererseits getrennt^[43]. Das für die Trennung nutzbare Elutionsvolumen kann sich folglich nur zwischen zwei Grenzwerten bewegen: dem Flüssigkeitsvolumen zwischen den Partikeln (V_0) und dem totalen Diffusionsvolumen als Summe aus V_0 und dem Porenvolumen V_i . Die Peakkapazität ist damit begrenzt. Für das Elutionsvolumen V_e eines Substanzpeaks gilt:

$$V_e = V_0 + K_D \cdot V_i$$

Der Verteilungskoeffizient K_D geht gegen 0 für sehr große Moleküle. Diese können nicht in die Poren diffundieren und eluieren daher am schnellsten. K_D ist 1 für kleine Moleküle, die ungehindert in alle Poren eindringen können und so die größte Verzögerung erfahren.

Im Bereich $K_D = 0.15\text{--}0.80$ besteht im allgemeinen ein lineares Verhältnis zwischen dem Verteilungskoeffizienten und dem Logarithmus des Molekulargewichts. Die Gelfiltration kann damit zur Charakterisierung eines Proteins herangezogen werden, wenn Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen und Partikeloberfläche ausgeschlossen sind und das Protein in regulärer, nicht aggregierter Form vorliegt. Nichtideales Säulenverhalten kann mit einfachen Tests^[44] untersucht werden.

Das Auflösungsvermögen der Säule hängt von der Säulendimension, der Packungsdichte der Füllung, dem Porenvolumen, der Verteilung der Poredurchmesser und schließlich der Peakbreite ab. Da die Trennung nur innerhalb eines begrenzten Elutionsvolumens stattfindet, muß ein möglichst geringes Volumen für die einzelnen Peaks angestrebt werden.

Die Peakbreite ist mit dem Molekültransport zwischen den Phasen verknüpft und erreicht ein Optimum bei geringer Partikelgröße^[45], niedriger Durchflußgeschwindigkeit und Viskosität des Fließmittels und hohem Diffusionskoeffizienten des Proteins. Aus diesem Zusammenhang heraus ist verständlich, daß hinsichtlich Probenvolumen und Konzentration engere Grenzen (ca. 100 µg bzw. 10 µL pro mL Säulenvolumen) gesteckt sind als bei den adsorptiven Techniken^[46].

Alle anderen, oben genannten Parameter sind feste Eigenschaften der Säulenfüllung. Sphärische Partikel lassen sich wesentlich dichter packen als unregelmäßig geformte, so daß V_0 – der nicht für die Trennung nutzbare Bereich – nur 37% des Säulenvolumens ausmacht^[44]. Ein großes, für die Trennung verfügbares Volumen wird außerdem durch ein großes Porenvolumen V_i erreicht. Dabei ist ein Kompromiß zwischen großem Porenvolumen und hoher mechanischer Festigkeit zu schließen^[44, 46]. Eine enge Porengrößenverteilung ist für eine hohe Auflösung vorteilhaft, aber auch der Packungsprozeß selbst spielt offenbar eine bedeutende Rolle für die Leistungsfähigkeit der Säulen^[44].

Unter den für die Gelfiltration entwickelten organischen Polymerpartikeln wird die TSK-PW-Serie (Fa. Biorad) häufiger eingesetzt; die hydrophoben Wechselwirkungen, die bei allen derartigen Materialien unvermeidbar sind (siehe Abschnitt 3.3), scheinen hier am wenigsten ausgeprägt zu sein und erlauben sehr effiziente Proteintrennungen, vor allem im extrem hochmolekularen Bereich^[47].

Kieselgele zeigen bessere Trennleistungen in engeren Molekulargewichtsbereichen^[48, 49]. Die Oberflächenbehandlung mit hydrophilen Organosilanen^[50, 51] oder organischen Polymeren^[52] soll Silanolgruppen blockieren und Adsorptionseffekte ausschließen. Sie ist aus sterischen Gründen nie vollständig^[53], so daß diese Materialien stets den Charakter von Ionenaustauschern haben. Durch Anwesenheit von Salzen im Elutionsmittel kann dies ausgeglichen werden^[44]. Eine zu hohe Salzkonzentration ist allerdings ebenso unerwünscht, da dann die hydrophoben Wechselwirkungen verstärkt werden. Besondere Aufmerksamkeit verdient eine neue Variante der Oberflächenbehandlung (Zirconium-Einbau), die einen Träger mit höherer pH-Stabilität liefert^[54].

Kieselgele sind auch in Gegenwart chaotoper Salze oder Detergentien mechanisch sehr stabil. Guanidiniumchlorid, Natriumdodecylsulfat, Harnstoff und organische Lösungsmittel können eingesetzt werden, um Proteine vor der Trennung zu denaturieren, die Eigenassoziation zu verhindern und die Löslichkeit zu erhöhen^[55–58]. Dabei kann jedoch der hydrodynamische Radius der Proteine stark erhöht und der Fraktionierungsbereich zu niedrigeren Molekulargewichten verschoben werden. Abbildung 2 zeigt dies am Beispiel der Gelfiltration von zwei Proteinstandards.

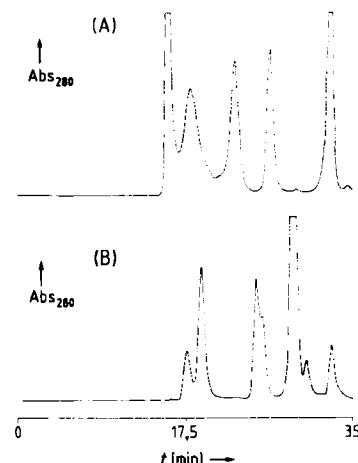


Abb. 2. Gelfiltration von Proteinstandards auf Bio-Sil-TSK 125 (7,5 mm × 60 cm); 0,7 mL/min; Raumtemperatur; Abs_{280} = Absorption bei $\lambda = 280$ nm; t = Retentionszeit. (A): 20 mM Natriumphosphat/0,1 M Natriumsulfat; pH 6,8. Peaks in der Reihenfolge der Elution: Thyroglobulin (MG 670000); Gamma-Globulin (MG 158000); Ovalbumin (MG 44000); Myoglobin (MG 17000); Vitamin B₁₂ (MG 1350). (B): 20% Essigsäure/30% Acetonitril; pH 3,0. Myoglobin (MG 17000), 17,8 min; Cytochrom c (MG 12500), 19,11 min; Insulin (MG 5850), 24,9 min; Insulin-B-Kette (MG 3400), 25,5 min; Phenyl-azo-Z-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (MG 777), 28,7 min; Natriumazid (MG 65), 32,7 min. MG = relative Molmasse. Z = Benzoyloxycarbonyl.

3.2. Ionenaustauschchromatographie

Aufgrund ihres amphoteren Charakters können Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert kationisch oder anionisch vorliegen. Eine charakteristische Größe ist der isoelektrische Punkt, an dem die Nettoladung des Proteins Null ist. Dieser bestimmt den pH-Wert des Mediums und die Wahl des Ionenaustauschertyps. Die Bindungsstärke wird von der Anzahl kooperativ wirksamer ionischer Gruppen am Protein, der Ladungsdichte des Ionenaustauschers (theoretische Kapazität) und der Ionenstärke der mobilen Phase beeinflußt. Die Elution der Proteine kann demzufolge durch Anlegen eines Gradienten steigender

Ionenstärke, eines pH-Gradienten oder einer Kombination aus beidem erreicht werden. Für den Anwender ergibt sich ein breiter Spielraum zur Beeinflussung von Retention und Selektivität.

Lange standen vom Kieselgel abgeleitete Trägermaterialien im Vordergrund. An ihnen wurde die überwiegende Zahl systematischer Studien zur Ionenaustausch-HPLC von Proteinen durchgeführt^[59]. Organische Polymere auf Methacrylat-Basis, die nur mit relativ grobem Korn erhältlich und relativ hydrophob sind^[60], setzten sich nicht durch. In neuerer Zeit sind jedoch hydrophile organische Polymere wie die erwähnte TSK-PW-Serie hinzugekommen, die – bei etwas geringeren Durchflußgeschwindigkeiten und Drücken – auf analytischem und präparativem Sektor gute Ergebnisse liefern^[61–65]. Ihre Stabilität im alkalischen Bereich lässt eine größere Bandbreite an Puffersystemen und effizientere Regenerierverfahren zu. Das erhöht die Lebensdauer der Säulen, auch wenn sie zur Trennung von Rohextrakten verwendet werden^[62].

Kieselgele stehen mit vielen Porengrößen und ionischen Liganden zur Verfügung. An stark sauren und stark basischen Ionenaustauschern werden im allgemeinen höhere Auflösung und Detektionsempfindlichkeit erzielt, weil durch bessere Desorption das Peakvolumen kleiner wird. Die pH-Variation der mobilen Phase ist in der Regel so gering, daß sich der Ionisierungsgrad des Austauschers nicht ändert; das Optimierungsproblem ist also weniger komplex^[29, 66]. Eine besonders stabile und effiziente Abschirmung unspezifischer Bindungsstellen auf der Kieselgeloberfläche und eine hohe Austauscherkapazität erreicht man, wenn man die ionischen Liganden in einer dünnen Polymerschicht vernetzt^[67–70]. Die theoretische Kapazität ist dabei proportional zur gesamten Partikeloberfläche und daher bei kleinporigem Material am größten. Ionenaustauscher mit weiteren Poren sind aber für höhermolekulare Proteine besser zugänglich und weisen deshalb die größere effektive Kapazität auf. Zusätzlich spielt die Optimierung der Peakschärfe durch möglichst ungehinderte Diffusion eine Rolle. Für die meisten Proteintrennungen ist daher ein 300 Å-Material die beste Wahl, während für Moleküle mit einem Molekulargewicht über 150 000 Materialien mit einem Porendurchmesser von 1000 Å und mehr vorzuziehen sind^[16, 27, 66].

Üblicherweise wird die Elution mit einem Salzgradienten bei konstantem pH-Wert durchgeführt. Da die Verdrängungswirkung einer Reihe von Ionen für verschiedene Proteine völlig verschieden sein kann^[29], kann ein Austausch des Verdrängeragens zu veränderten Selektivitäten führen. Daneben lässt sich durch geschickte Wahl des Salztyps die Verteilung der Probenkomponenten und die Auflösung im Anfangsbereich des Gradienten optimieren und der Wiedergewinnungsanteil besonders fest adsorbiertener Proteine erhöhen^[29].

Die Retentionszeit eines Proteins ist um so länger, je größer der Abstand zwischen isoelektrischem Punkt des Proteins und pH-Wert des Puffers ist^[62]. Auch über diesen Parameter ist die Selektivität zu beeinflussen, da die Form der Titrationskurve für jedes Protein charakteristisch ist. Als günstiger Ausgangspunkt kann pH 7 angesehen werden, der bei Anionen- und Kationenaustauschchromatographie zur besten durchschnittlichen Selektivität führt^[29]. Für die Trennung einzelner Proteinpaare kann ein anderer

pH-Wert vorteilhafter sein. Dieser lässt sich jedoch oft nur empirisch ermitteln und nicht zwangsläufig aus der Titrationskurve eines Proteins ableiten^[7].

Einfacher als die Zusammensetzung der mobilen Phase sind die übrigen Bedingungen zu optimieren. Das Gesamtvolumen des Salzgradienten liegt im allgemeinen zwischen 5 und 15 Säulenvolumen. Erniedrigung von Durchflußgeschwindigkeit und Gradientensteigung verbessern die Auflösung erheblich^[16, 59]. Auch eine Temperaturerhöhung hat einen positiven Einfluß^[16]. Die Beladbarkeit der heute erhältlichen Säulentypen ist hoch: 2–3 mg Protein pro mL Packungsvolumen lassen sich durchaus ohne Verlust an Auflösung trennen^[16, 63]. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, liegt die Wiedergewinnungsrate weit über 90%^[29, 71].

3.3. Hydrophobchromatographie (Aussalzchromatographie)

Hydrophobe Wechselwirkungen sind für die Faltung von Proteinen und die Stabilisierung ihrer Tertiärstruktur wichtig^[72]. Bei löslichen Proteinen sind unpolare Aminosäureseitenketten im wesentlichen im abgeschirmten Inneren der dreidimensionalen Struktur lokalisiert. Trotzdem haben Proteine auch einige hydrophobe Kontaktstellen auf der Oberfläche, die zur Adsorption an unpolare stationäre Phasen führen. In der konventionellen Affinitätschromatographie wurde dieser Effekt zunächst als anomales Retentionsverhalten registriert und später gezielt für die Trennung von Proteinen an alkylierten Agarosegelen eingesetzt^[73–75]. Adsorption von Proteinen an HPLC-Gelfiltrationssäulen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen wurde unter bestimmten Bedingungen beobachtet^[44, 76]. Später wurden für diese Varianten der HPLC spezielle Phasen auf der Basis von Kieselgel^[77–80] oder organischen Polymeren^[81, 82] entwickelt.

Die Bindung erfolgt in Gegenwart hoher Ionenkonzentrationen^[73, 74]. Salztyp und -konzentration sind entscheidend für die Retention: Sie ist größer mit Salzen, die einen hohen Aussalzeffekt auf Proteine aufweisen^[79, 82–84]. Die Stärke der hydrophoben Wechselwirkung nimmt mit steigender Temperatur zu^[30, 79]; durch Zusatz geringer Anteile eines organischen Lösungsmittels oder chaotropen Agens (Harnstoff, Guanidiniumchlorid) wird die Retention dagegen geringer^[30, 82]. Theoretisch sollte am isoelektrischen Punkt die Bindung am stärksten sein^[85], in der Praxis kann aber der Einfluß des pH-Werts auf die Retention verschiedener Proteine je nach Matrix unterschiedliche Größenordnungen und Formen annehmen, die möglicherweise auf Ladungseffekte der stationären Phase zurückzuführen sind^[82, 83]. Außerdem kann die Selektivität der Trennung durch Temperaturänderung und Zusatz organischer Lösungsmittel zum Eluens stark beeinflußt werden^[30, 82, 83].

Der Salztyp ist auch für die Auflösung von Bedeutung: Für hydrophilere Proteine (schwach bindend) sind Neutralsalze mit hohem Aussalzeffekt, für hydrophobere Proteine (stark bindend) solche mit niedrigem Aussalzeffekt vorteilhaft^[78]. Die Auflösung kann durch längere Säulen^[22, 82], geringere Durchflußgeschwindigkeiten^[82], flachere Gradienten^[22, 82], Zusatz chaotroper Agentien oder organischer Lösungsmittel^[30, 82] weiter erhöht werden. Niedrigere Temperaturen sind ebenfalls von Vorteil^[30, 49]. Denaturierung durch Matrixkontakt^[22, 86] ist bei dieser Me-

thode selten. Beladbarkeit der Säulen und Wiedergewinnungsraten liegen etwa im gleichen Bereich wie bei der Ionenaustrauschchromatographie.

3.4. Umkehrphasenchromatographie

Die Umkehrphasenchromatographie (Reversed-Phase(RP)-Chromatographie) wurde bereits 1950 eingeführt^[87] und hat sich aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten zur bevorzugten HPLC-Methode entwickelt^[88]. Sie ist im Grunde eine Variante der Hydrophobchromatographie (siehe vorigen Abschnitt). In beiden Fällen findet eine Bindung zwischen unpolaren Oberflächen von stationärer Phase und Proteinen und damit eine Abschirmung gegenüber der polaren (wässrigen) mobilen Phase statt^[89-91]. Im Gegensatz zur Hydrophobchromatographie werden hier jedoch wesentlich unpolarere, d. h. höher alkulierte, stationäre Phasen eingesetzt, so daß die Proteine schon aus wässrigem Puffer niedriger Ionenstärke an die Matrix binden. Die differenzierte Ablösung erfolgt durch Gradientenelution mit steigendem Gehalt an organischem Lösungsmittel. Dieses erniedrigt einerseits die Oberflächenspannung der mobilen Phase und begünstigt die Bildung einer Solvathülle um das freigesetzte Molekül^[89-91], und es bewirkt andererseits die Desorption durch direkte kompetitive Wechselwirkung mit Protein und Matrix. Eine Reihe von theoretischen Ansätzen zur quantitativen Beschreibung der komplexen thermodynamischen und kinetischen Phänomene in den Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase, Komponenten des Eluens und Probenmolekülen, insbesondere der Beziehung zwischen Retention und Fließmittelzusammensetzung, sind in der Diskussion^[92-94].

An der Wechselwirkung eines Proteins mit der Matrix können zahlreiche Bindungsstellen beteiligt sein^[5,6,17,95]. Adsorptionseffekte, nicht eine Verteilung zwischen stationärer und mobiler Phase, sind daher maßgebend^[95,96]. Im Verlauf der Gradientenelution werden die schwächer bindenden Lösungsmittelmoleküle zunächst nur freie Kontaktstellen auf der Matrix und der nicht an der Adsorption beteiligten Proteinoberfläche belegen. Bei Erreichen einer kritischen Konzentration^[9,10,94,97] wird das Protein dann schlagartig von der Matrixoberfläche verdrängt. Dieses Konzept der kompetitiven Wechselwirkungen zwischen Matrix, Protein und Lösungsmittel ist die Basis eines neuen stöchiometrischen Verdrängungsmodells^[8], das in Einklang mit der allgemeinen Gradientenelutionstheorie^[4] sehr gut die experimentell gefundenen Einflüsse der Molekulgröße und der Lösungsmittelzusammensetzung erklärt.

Die Retention eines Probenmoleküls hängt vom Verhältnis polarer und unpolarer Aminosäureseitenketten auf dem Teil der Oberfläche ab, der die Bindung an die stationäre Phase bewirkt. Bei kleineren Polypeptiden (<20 Aminosäuren) kann die Retentionszeit aus der Summe der relativen Hydrophobien einzelner Aminosäuren gut berechnet werden^[98-101]. Bei Proteinen lassen sich jedoch aufgrund der Tertiärstruktur kaum Voraussagen machen^[102-104]. Selbst im Fall der B30-Analoga von Insulin (siehe Abschnitt 4.I und Abb. 5) führt der Einbau bestimmter Aminosäuren zu einer Abweichung der Retentionszeiten vom vorherberechneten Wert. Unter den für die RP-HPLC üblichen Elutionsbedingungen müssen außerdem Konforma-

tionsänderungen in Betracht gezogen werden^[105], die von der Zusammensetzung des Eluens und anderen Parametern abhängen und im Extremfall sogar zu multiplen Peaks (native und denaturierte Formen) führen können^[106-109].

Das Verhalten einer Matrix auf Kieselgelbasis wird nicht nur durch die unpolaren Liganden, sondern in erheblichem Umfang durch die freien Silanolgruppen bestimmt. Silanophile Wechselwirkungen können dazu führen, daß bei Erhöhung des Anteils an organischem Lösungsmittel im Eluens die Retention zunächst wie erwartet zurückgeht, dann aber erneut ansteigt^[97]. Ionische Fließmittelkomponenten unterdrücken diese Wechselwirkungen, führen zu schärferen Peaks und höherer Auflösung. Bestimmte Ionenpaar-Reagentien ermöglichen besonders milde Elutionsbedingungen. Erst die Einbeziehung dieser Erkenntnisse in die Optimierung der Trennbedingungen führte zur Überwindung der anfänglichen Schwierigkeiten^[110] in der RP-HPLC von Proteinen.

Der HPLC-Anwender sieht sich heute einer fast unüberschaubaren Vielfalt stationärer Phasen gegenüber, die von den Kieselgel-Derivaten eindeutig dominiert wird. Zwei weitporige Materialien auf Polystyrolbasis sind erst seit kurzer Zeit auf dem Markt^[112,113]. Ihr Vorteil liegt in der Möglichkeit zur effektiveren Regenerierung durch Waschen mit verdünnter Natronlauge. Stationäre Phasen mit Porengrößen von etwa 300 Å sind hinsichtlich Beladungskapazität, Auflösung und Wiedergewinnung für Proteine mit Molekulargewichten über 20 000 am günstigsten^[25,26,96,104,114-116]. Die Retention der meisten Proteine ist bei gleicher Belegungsdichte im wesentlichen unabhängig von der Kettenlänge des Alkylliganden^[115,117,118]. Dagegen ist der Alkylierungsgrad für das Auflösungsvermögen und die schonende Elution von Proteinen eine kritische Größe^[92,93,119-122]. Weitporige Partikel haben dabei den Vorteil, daß wegen der kleineren Gesamtobерfläche eine optimale Belegungsdichte (ca. 3-4 µmol Alkylrest/m²) schon bei einem sehr niedrigen Kohlenstoffanteil (2-4 Gew.-% C) erreicht wird^[120,121]. Dies wiederum erlaubt die Elution der Proteine bei niedrigeren Konzentrationen des organischen Lösungsmittels^[92,93,120]. Octyl- oder Octadecylreste führen gegenüber kurzen Alkylresten (<C₄) zur effektiveren Abschirmung noch vorhandener Silanolgruppen^[120]. Die weitere Unterdrückung silanophiler Wechselwirkungen durch Nachbehandlung der alkylierten Kieselgele mit reaktiven Silanen geringer Größe („end-capping“) wird empfohlen^[93,120].

Elektrostatische Wechselwirkungen mit freien Silanolgruppen führen zu starken Peakasymmetrien oder sogar zu irreversibler Adsorption von Proteinen an die RP-Matrix. Da bei niedrigen pH-Werten (<4) die Dissoziation der Silanolgruppen stark zurückgedrängt ist^[123], werden dort im allgemeinen die besten Resultate erzielt^[26,93,103,116,124]; so gelangen befriedigende Proteintrennungen schon mit verdünnter Salzsäure^[12,23,104,116,117]. Verschiedene Puffersubstanzen können aber über eine Ionenpaarbildung den Proteinen eine völlig neue Retentionscharakteristik verleihen^[92,93,111,125]. Beispiele sind Phosphorsäure, Perchlorsäure, perfluorierte Carbonsäuren oder Alkylsulfonsäuren und ihre Salze. Phosphorsäure verkürzt^[126], perfluorierte Carbonsäuren verlängern die Retentionszeit^[95,127]. Kationische Eluenskomponenten beeinflussen direkt die Matrixeigenschaften. Ammonium-, Alkylammonium-, Pyridi-

nium- oder Morpholinium-Ionen desaktivieren Silanolgruppen durch Wasserstoffbrückenbindung und elektrostatische Wechselwirkungen^[92, 128]. Chaotrope Salze (z. B. NaClO₄, Na₂SO₄) tragen in höheren Konzentrationen (<0.1 M) durch besondere, über die elektrostatische Abschirmung von Silanolgruppen hinausgehende Effekte zu erhöhter Peakschärfe und verbesserter Elution bei^[100, 129-131].

Unter allen bekannten Puffersystemen hat verdünnte Trifluoressigsäure (TFA) die weiteste Verbreitung gefunden^[17-19, 83, 95, 96, 132-137], während längerkettige perfluorierte Carbonsäuren wesentlich seltener eingesetzt werden^[95, 104, 133, 138]. Trifluoressigsäure ist UV-durchlässig und leicht flüchtig und damit auch für präparative Arbeiten geeignet. Sie wird, ebenso wie verdünnte Ameisensäure^[139], besonders für die Trennung hydrophober Proteine oder Proteinfragmente empfohlen^[95, 127]. Die Elution von Strukturproteinen des Poliovirus gelang allerdings mit keinem dieser Systeme, sondern nur mit hochkonzentrierter Ameisensäure^[140]. Pyridin/Essigsäure oder Pyridin/Ameisensäure sind ebenfalls flüchtige Puffer, die bei pH 3-5, also für die Arbeit mit säurelabileren Proteinen, mit sehr gutem Erfolg anwendbar sind^[26, 141-145]. Nachteilig ist hier die geringe UV-Durchlässigkeit, die zur Detektion bei $\lambda = 280$ nm oder einer Nach-Säulen-Derivatisierung (siehe Abschnitt 2.6) zwingt. Elutionsmittel mit noch höherem pH-Wert enthalten Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7.8)^[147] oder Hexafluoraceton/Ammoniak (pH 7.2)^[148].

Als nichtflüchtiger Puffer wird am häufigsten Phosphat verwendet^[28, 98, 100, 103, 111, 149], sehr oft in Form von Tri- oder Tetraalkylammoniumsalzen^[111, 150-153] und unter Zusatz von Natriumperchlorat^[25, 100, 129-131]. Meistens wird auch dabei unterhalb pH 4 gearbeitet, seltener bei höheren pH-Werten^[154]. Auch über Trennungen mit Tris-Puffer bei pH 7.5 wurde berichtet^[155].

Die organische Komponente muß einerseits einen unpolaren Charakter haben, um die Desorption von der Matrix zu bewirken, andererseits aber noch genügend polar sein, damit das Protein nicht ausfällt. Dadurch ist man im wesentlichen auf Acetonitril und Alkohol angewiesen. Für die Reinigung von Interferon wurde Dioxan benutzt^[156]. Die Elutionskraft steigt in der Reihenfolge Methanol, Ethanol, Acetonitril, Propanol, Butanol^[93]. Durch Änderung oder Kombination der Lösungsmittel lassen sich andere Selektivitäten erzielen^[98, 131, 148, 157-160]. Geringe Zusätze von Methoxyethanol können die Auflösung verbessern^[92, 149]. Propanol wird für größere, hydrophobe Proteine empfohlen. Da der Gehalt an organischer Komponente im Eluat damit geringer gehalten werden kann, sind weniger Probleme durch Ausfällung und Denaturierung zu erwarten^[127, 141]. Gelegentlich erhält man dabei aber breitere Peaks^[100, 112, 148], was sich – bei hinreichender Stabilität des Proteins – durch Temperaturerhöhung wieder ausgleichen lässt^[28]. Im übrigen wurden bei Temperaturerhöhungen sowohl Verbesserungen^[98] als auch Qualitätseinbußen^[103, 116, 128] in der Trennleistung beschrieben. Die Auflösung nimmt mit sinkender Durchflußgeschwindigkeit und flacherem Gradienten zu^[26, 92, 119, 142].

Die Elutionsbedingungen der RP-HPLC vermindern nicht nur die Löslichkeit vieler Proteine, sondern können auch Konformationsänderungen induzieren^[105]. Bei labilen Proteinen kann es zu völliger Denaturierung mit irreversibler Adsorption oder Ausfällung kommen. Dies stört

vor allem bei präparativem Arbeiten, es kann aber auch die Exaktheit quantitativer Analysen beeinträchtigen. Beispiele für die erfolgreiche Isolierung funktionell intakter Proteine durch RP-HPLC in Gegenwart von stabilisierenden Cofaktoren oder durch spezielle Nachbehandlung der Fraktionen sind vorhanden^[136, 155, 161-163]. Es kommt jedoch auch vor, daß bestimmte Proteine mit geringer Ausbeute oder zunächst inaktiv eluiert werden^[12]. Neuere Studien^[86, 106, 122, 164, 165] zum Mechanismus dieser Vorgänge ergaben, daß sich bei Säulenkontakt eine je nach Protein unterschiedlich schnell verlaufende Denaturierung vollziehen kann; der Denaturierungsgrad hängt davon ab, wie lang das Protein mit der Matrix und dem Lösungsmittel in Kontakt ist. Bei der Desorption wird eine Rückfaltung in die natürliche Struktur eingeleitet. Von der Kinetik dieser Teilschritte im Vergleich zur Separationskinetik wird das Elutionsverhalten bestimmt: a) einzelne Peaks geringer Breite, wenn es sich entweder um besonders stabile Proteine handelt (keine Denaturierung) oder die Rückfaltung stark gehemmt ist (nur Denaturierungsprodukt); b) multiple^[106-109, 112, 165] oder extrem asymmetrische^[28, 112, 121, 122, 164, 165] Peaks, wenn native und (mehrere) denaturierte Formen im Gleichgewicht vorliegen. Stärker eluotrope Lösungsmittel, hydrophile Ionenpaarreagentien, Senkung der Konzentration perfluorierten Carbonsäuren oder steilere Gradienten hemmen die Denaturierung an der stationären Phase^[106, 112]. Dies führt zu höheren Wiedergewinnungsraten und weitgehender Erhaltung der nativen, biologisch aktiven Form^[28, 112, 116, 166]. Hohe Salzkonzentrationen können sich dagegen negativ auswirken^[28, 116], da sie den Matrixkontakt verstärken. Hohe Durchflußgeschwindigkeiten und Temperaturen lassen keine ausreichende Rückfaltung zu, so daß im Extremfall nur die denaturierte Form eluiert wird^[164, 165] oder sogar irreversible Bindung stattfindet^[112, 165]. Man erhält dann zwar eine hohe Auflösung^[28], aber geringe Wiedergewinnungsraten^[116].

Die RP-HPLC ist mit Sicherheit eine der leistungsfähigsten Trennmethoden, deren größtes Potential in der Separation eng verwandter Proteine und Proteinderivate liegt, da Selektivität und Auflösung in vielfältiger Weise manipuliert werden können. Die proteinchemischen Konsequenzen der Elutionsbedingungen müssen jedoch für jede Anwendung neu erarbeitet werden.

3.5. Andere Techniken

Die Adsorption an Hydroxyapatit ist zentraler Bestandteil eines Systems zur Reinigung monoklonaler Antikörper^[167], läßt sich aber auch für andere Trennprobleme nutzen^[168]. Die Affinitätschromatographie^[169] trägt das Merkmal biospezifischer Selektion aus komplexen Gemischen und stellt daher keine hohen Anforderungen an die Elutionstechnik. Bei der HPLC-Version dieser Methode steht folglich auch mehr die Geschwindigkeit als die Hochauflösung im Vordergrund. Stationäre Phasen wurden durch Kupplung der jeweiligen Liganden an Glas^[170], Kieselgel^[171, 172] oder organische Polymere^[173] von den Anwendern selbst hergestellt. Einige Liganden wie Adenosinmonophosphat^[171], Protein A^[170], Lectine^[174] oder der Pseudoaffinitätsligand Cibacronblau^[175] sind vielfältig nutzbar; hier wären Fertigsäulen denkbar. Bei der Fülle anderer

spezifischer Liganden wird sich eine Eigenherstellung nie umgehen lassen. Zur Vereinfachung kann man jedoch auf eine fertig gepackte, voraktivierte Säule zurückgreifen, die im langsamen Durchfluß mit dem Liganden umgesetzt wird^[176]. Mit kommerziell erhältlichen Ionenaustauschern und Pufferlösungen kann die Chromatofokussierung durchgeführt werden^[177, 178]. Sie trennt wie ihr elektrophoretisches Gegenstück nach dem isoelektrischen Punkt.

4. Insulin

Das blutzuckersenkende Hormon Insulin ist ein kleines Protein. Es hat ein Molekulargewicht von 5800 und ist aus zwei über zwei Disulfidbrücken verknüpften Peptidketten aufgebaut; die A-Kette hat 21 Aminosäuren und die B-Kette 30. Eine dritte Disulfidbrücke verbindet die Cysteinreste an Position 6 und 11 innerhalb der A-Kette^[179, 180].

Insulin hat eine relativ starre Struktur^[181] und eine vergleichsweise hohe Stabilität; für die HPLC-Analytik ist es deshalb ein einfaches Problem^[182-186]; über HPLC getrennte Insuline bleiben normalerweise biologisch und immunologisch aktiv^[187-189]. Darüber hinaus hat Insulin eine herausragende Bedeutung in pharmazeutischer Forschung und Anwendung, weshalb es sich wie kein anderes Protein als Beispiel zur Demonstration der Anwendungsbreite der HPLC von Proteinen eignet.

Für das präparative und analytische Arbeiten ist dabei wichtig, daß Insulin in der Nähe seines isoelektrischen Punktes bei pH 5.4 schwerlöslich ist, in saurer Lösung dissoziiert, in neutraler dagegen Dimere und Hexamere bildet. Das Hexamer wird durch Zink stabilisiert. Trennungen oberhalb des isoelektrischen Punktes gelingen nur mit Zink-chelierenden und dissoziierenden Zusätzen, wie etwa Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) und Alkoholen^[190], Harnstoff^[191] oder Detergentien^[192].

Zur Gewinnung von Insulin haben heute zwei Methoden, die Isolierung aus tierischem Pankreas^[193] und die gentechnische Herstellung, Bedeutung. Das Insulin aus den Bauchspeicheldrüsen von drei Schweinen deckt den Bedarf eines Diabetikers für etwa zehn Tage. Aus Schweineinsulin läßt sich durch Semisynthese Humaninsulin herstellen. Praktisch nicht limitiert ist demgegenüber die Expression von Humaninsulin in genetisch veränderten Mikroorganismen^[194-197], deren Kohlenstoffquelle Glycerin oder einfache Zucker sind.

4.1. Semisynthese von Humaninsulin

Humaninsulin unterscheidet sich von Schweineinsulin nur in der Aminosäure an Position 30 der B-Kette. N-terminal dazu befindet sich an Position B29 Lysin, so daß ein Austausch von Alanin (Schweineinsulin) gegen Threonin (Humaninsulin) prinzipiell mit Hilfe von Trypsin möglich ist (Abb. 3). Obwohl das Enzym Trypsin in wäßrigem Medium bei pH 7 Peptidbindungen an basischen Aminosäuren spaltet, kann es auch bei niedrigerem pH und in geeignetem Medium die Knüpfung von Peptidbindungen^[198, 199] oder auch direkt den Austausch einer Aminosäure ohne Auftreten eines intermediären Hydrolyseprodukts katalysieren^[199-201]. Der Austausch entspricht formal einer Aminolyse des Acyl-Enzymkomplexes. Hinweise auf einen Di-

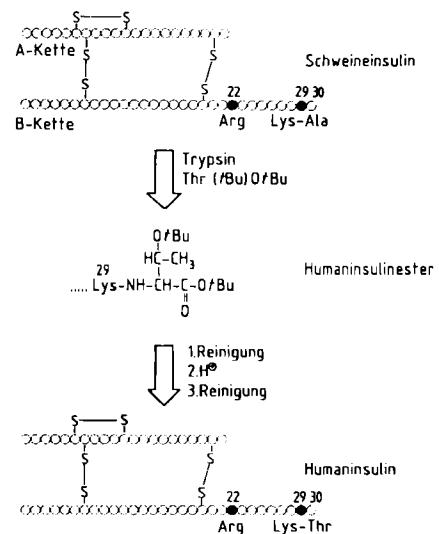


Abb. 3. Semisynthese von Humaninsulin aus Schweineinsulin.

rektaustausch bei der Humaninsulin-Semisynthese ergeben sich aus der HPLC-Analyse von Reaktionsgemischen (Abb. 4): Nach Umsetzung mit Threonin-*tert*-butylester, dessen OH-Gruppe ebenfalls *t*Bu-geschützt ist, ist Des-(B30)-Insulin nicht nachweisbar, sondern es erscheinen nur der gewünschte seitenkettenveretherte Humaninsulinester (III), unumgesetztes Schweineinsulin (II) und Des-(B23-B30)-Insulin (I), ein durch Proteolyse an Arginin(B22) entstandenes, unerwünschtes Nebenprodukt, das aber offenbar aus sterischen Gründen nur zu geringen Anteilen entsteht^[202].

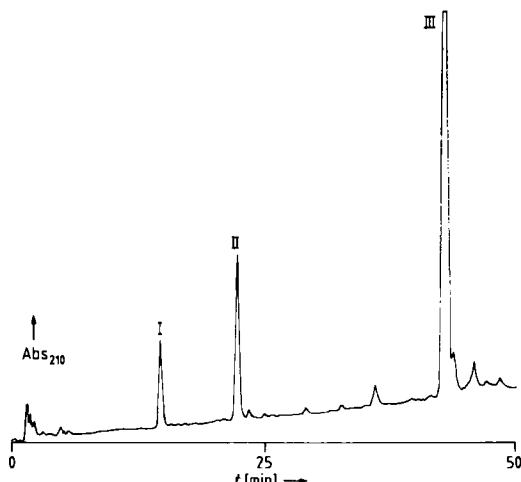


Abb. 4. Chromatogramm der HPLC-Trennung des Reaktionsgemisches der Humaninsulin-Semisynthese. HPLC-System: Waters-RCCS-RP-8, 10 µm, 50 mM Tetraethylammoniumphosphat, 0,25 M Natriumperchlorat, 10% Acetonitril, pH=3 (Puffer A) und 50 mM Tetraethylammoniumphosphat, 90% Acetonitril, pH=3 (Puffer B), Gradient von 28% bis 40% B, 1,5 mL/min, Raumtemperatur, Detektion bei $\lambda=210$ nm. t = Retentionszeit. I-III: siehe Text.

Durch Semisynthese sind eine Reihe von B30-Derivaten von Insulin hergestellt worden^[201], deren Verhalten in der Umkehrphasen-HPLC genau der Hydrophobieänderung^[100] der C-terminalen Region der B-Kette entspricht (Abb. 5). Aus dieser Serie fallen allerdings zwei Derivate heraus, das Thr(B30)-Insulin (Humaninsulin) und das

Tyr(B30)-Insulin, für die eine lokale Strukturveränderung, z.B. das Vorhandensein einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke, postuliert werden kann.

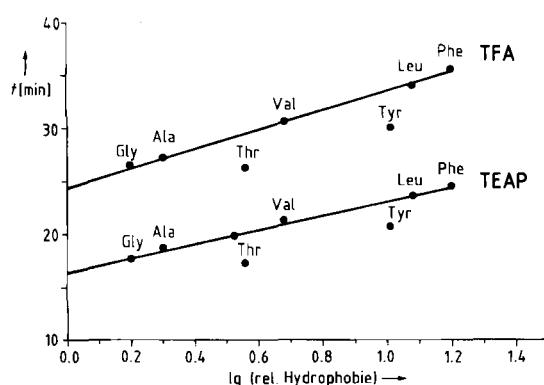


Abb. 5. Retentionszeiten verschiedener B30-Derivate von Insulin in der RP-HPLC als Funktion der relativen Hydrophobie der Aminosäure an Position B30, in den HPLC-Systemen TFA: Nucleosil-300-7-Protein-RP-Säule und 0.1% Trifluoressigsäure, pH=2.1, Gradient von 30% bis 40% Acetonitril, 0.8 mL/min, Raumtemperatur, und TEAP: Tetraethylammoniumphosphatpuffer, pH=3, wie in Abbildung 4.

4.2. Gentechnische Herstellung von Humaninsulin

Das Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Humaninsulin mit Mikroorganismen ist – mit Ausnahme der letzten Reinigungsstufen – grundlegend verschieden von der Isolierung aus Bauchspeicheldrüsen, bei der auf allen Stufen Insulin in der biologisch aktiven, nativen Tertiärstruktur vorliegt. Bei der gentechnischen Gewinnung sind die Vorstufen inaktive, zumeist schwerlösliche Vorläufer, die z.B. in der E.-coli-Zelle in großer Menge in Form von Einschlußkörpern deponiert werden (Abb. 6). Diese müssen durch aufwendige Proteinchemie – begleitet von entsprechender Analytik – in die native Struktur überführt werden (Abb. 6). Bei dem hier gezeigten Proinsulinkonzept wird die natürliche Faltungstendenz des physiologischen Insulinvorläufers genutzt^[203,204], in dem A- und B-Kette durch ein Peptidsegment, das C-Peptid, verknüpft sind. Das alternative Konzept, die getrennte Herstellung von A- und B-Kette, führt bei deren Rekombination zu niedriger Ausbeute und vielen Nebenprodukten. Dies war aber der zuerst beschrittene und auch in technischem Maßstab erfolgreiche Weg zur gentechnischen Herstellung von Humaninsulin^[194].

Die Aufarbeitung kann wie folgt geschehen: Nach Fermentation werden die Mikroorganismen abgeertet und der Insulinvorläufer angereichert. Der Vorläufer wird dann chemisch an Methionin fragmentiert, wobei das „Präproinsulin“, ein N-terminal um einige Aminosäuren verlängertes Proinsulin, entsteht. Die sechs Cysteinreste des Präproinsulins, die auf dieser Stufe zunächst in nicht exakt definierter Form vorliegen (*E. coli* hat kein Enzymsystem, das die Disulfidbrücken spezifisch knüpft), werden durch Sulfitolyse^[205] in die S-Sulfonate überführt. Auf dieser Stufe ist das Produkt erstmals durch HPLC erfassbar; in den davor vorhandenen Reaktionsgemischen sind entweder zu viele Nebenprodukte vorhanden oder die interessierenden Moleküle werden an Umkehrphasen irreversibel adsorbiert. Dies demonstriert eine der Limitierungen der HPLC-Analytik (Abb. 7A).

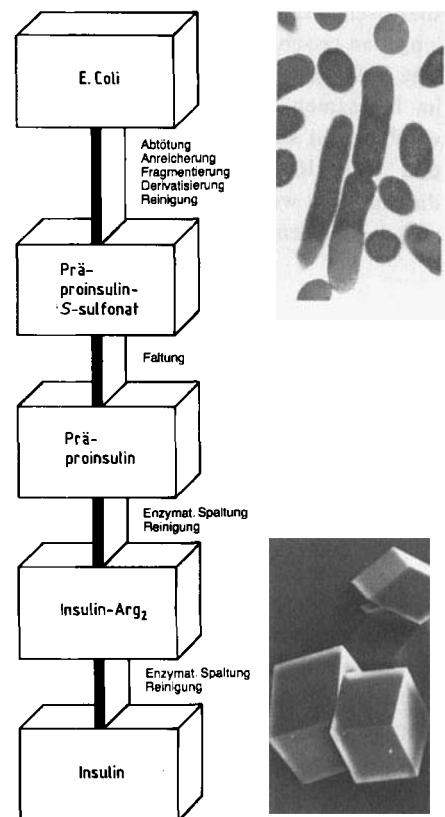


Abb. 6. Links: Schema der gentechnischen Gewinnung von Humaninsulin. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Insulinvorläufer-produzierenden *E. coli*-Stammes (oben) und der daraus isolierten Rhomboeder von Humaninsulin (kristallisiert in Gegenwart von Zink-Ionen) (unten).

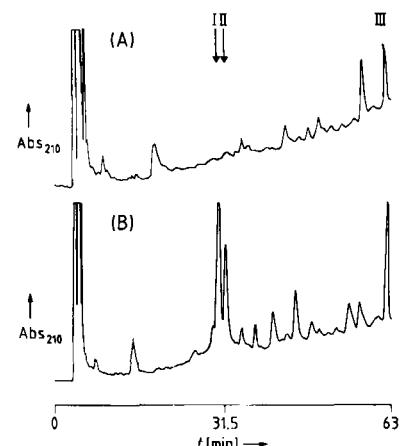


Abb. 7. Chromatogramme der HPLC-Trennung eines Reaktionsgemisches der gentechnischen Gewinnung von Humaninsulin nach Sulfitolyse und fraktionierender Fällung (B) und eines Gemisches nach chemischer Fragmentierung des angereicherten Insulinvorläufers (A). HPLC-System: PLRP-S-300-A (4.6 mm × 25 cm). Puffer A: 0.1 M Hexafluoracetone/NH₃, 2% Butanol, 8% Acetonitril, pH=7; Puffer B: 0.1 M Hexafluoracetone/NH₃, 9% Butanol, 81% Acetonitril, pH=7; Gradient von 20% bis 35% Puffer B, 0.8 mL/min, 40°C. I-III: siehe Text.

Das Präproinsulin-S-sulfonat ist ein stark saures Molekül. In der Umkehrphasen-HPLC kommen die üblicherweise verwendeten, sauren mobilen Phasen aus Gründen der Löslichkeit deshalb nicht in Frage. Es wurde ein neutrales Hexafluoracetonsystem^[148] angewendet, mit dem das Präproinsulin-S-sulfonat (I) auch von einem chemisch sehr ähnlichen Vorläuferfragment (II) getrennt analysiert wer-

den kann (Abb. 7B). III ist ein weiteres Fragment aus dem Vorläufer, das jedoch keine Cysteine enthält und daher schon ohne Herstellung eines stabilisierenden Derivats in einem scharfen Peak eluiert werden kann (Abb. 7A).

Das Präproinsulin-S-sulfonat ist nicht nur ein Zwischenprodukt mit Schlüsselstellung für Analytik und Reinigung, sondern aus ihm ist auch das nativ gefaltete Präproinsulin in hoher Ausbeute zugänglich^[206, 207]. Die Faltung und die korrekte Knüpfung der beiden kettenverbindenden Disulfidbrücken können mit einer Fingerprint-Analytik untersucht werden. Voraussetzungen waren

- die Bildung einer limitierten Anzahl von Fragmenten
- minimale unspezifische Reaktionen
- die Identifizierung der Fragmente
- eine schnelle und effektive Trenn- und Detektionsmethode.

Proteolytische Fragmentierung mit Staphylococcus-aureus-Protease V8 unter speziellen Bedingungen in Verbindung mit HPLC-Analytik erfüllen diese Bedingungen^[208]. S.-aureus-Protease V8 spaltet C-terminal zu Glutamat; das theoretische – und auch praktisch verifizierte – Spaltmuster ist in Abbildung 8 gezeigt. Von besonderer Bedeutung für die Analyse sind die Fragmente I, II und III. Fragment III enthält die C-terminale Region der B-Kette und ist vorhanden unabhängig davon, ob Präproinsulin-S-sulfonat, Disulfid-verknüpftes Präproinsulin oder andere Spezies gleicher Sequenz vorliegen. Es dient als innerer Standard zur Quantifizierung. Die Fragmente I und II werden demgegenüber nur dann quantitativ gefunden, wenn

die in ihnen jeweils enthaltene Disulfidbrücke vollständig erhalten geblieben ist. Nebenprodukte, wie etwa inkorrekt Disulfid-verknüpfte Spezies, würden neue Peaks auf Kosten der Peaks von I und II ergeben. Fingerprint-Analytik von Präproinsulin-S-sulfonat liefert keine Fragmente I und II, und Präproinsulin-S-sulfonat, das mit einem Überschuss an Thiol reduziert wurde, zeigt entsprechend erniedrigte Anteile an beiden Fragmenten. Ein S.-aureus-Protease-V8-Fingerprint von korrekt gefaltetem Präproinsulin ist als Vergleich in Abbildung 9 gezeigt.

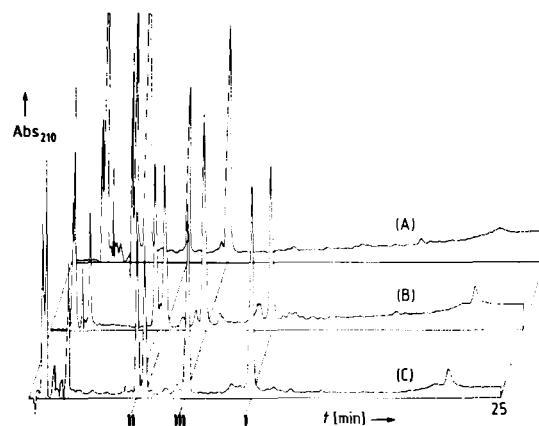


Abb. 9. Fingerprint-HPLC-Analyse von S.-aureus-Protease-V8-Fragmentgemischen von (A) Präproinsulin-S-sulfonat, (B) mit geringem Überschuss an Thiol reduziertem Präproinsulin und (C) korrekt gefaltetem Präproinsulin. HPLC-System: Waters-Rad-Pak-C-18, 5 µm, Puffer A und B wie in Abbildung 4, jedoch Gradient von 20% bis 45% B in 25 min. I–III entsprechen den Fragmenten in Abbildung 8.

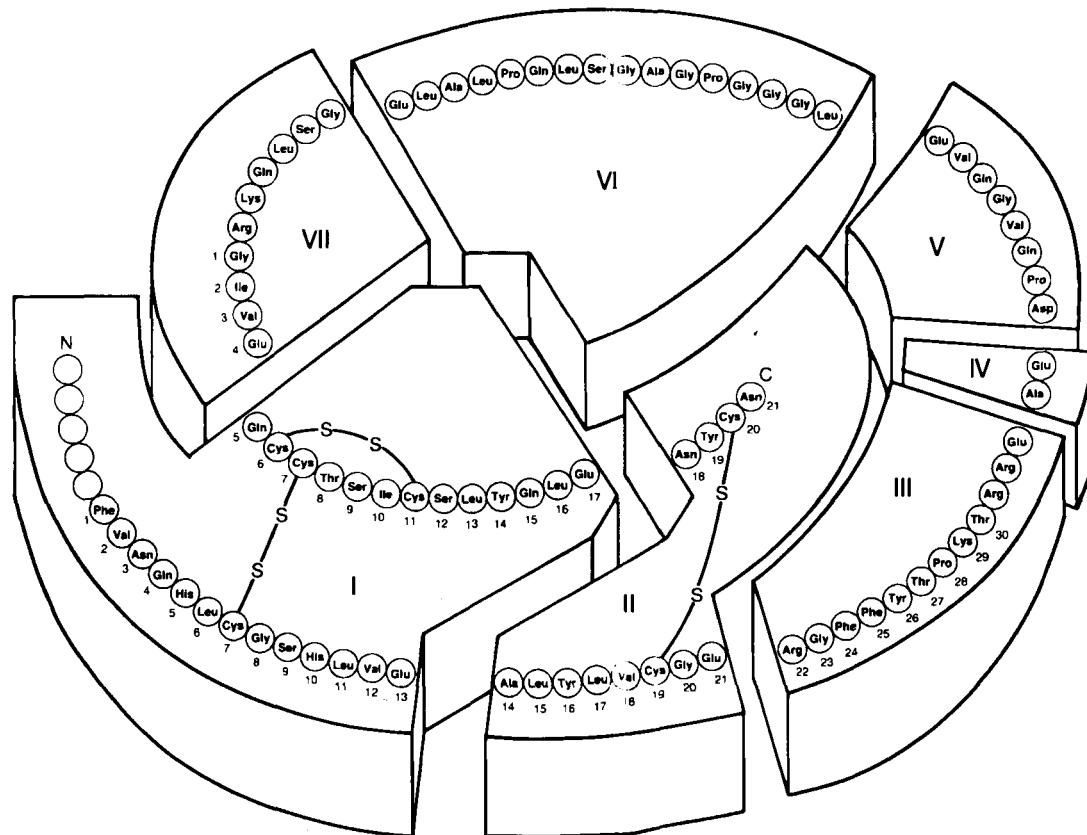


Abb. 8. Peptidfragmente von Präproinsulin nach Proteolyse mit S.-aureus Protease V8. Die Vorsilbe „Prä“ kennzeichnet, daß das Proinsulin N-terminal um fünf Aminosäuren (weiße Kreise) verlängert ist.

Die HPLC-Analytik ist auch für die Kontrolle der nachfolgenden Stufe, der enzymatischen Spaltung von Präproinsulin in Insulin-Arg₂ und Insulin-Arg essentiell (Abb. 10). Die Proteolyse von Präproinsulin mit Trypsin erfolgt prinzipiell an sechs Arginin- und Lysinresten (siehe Abb. 8). Kinetisch bevorzugt sind die Spaltungen an Arginin(A0), N-terminal zur A-Kette, an Arginin(B0), N-terminal zur B-Kette und an Arginin(B32). Spaltung an Lysin(B29) liefert in geringer Menge das Des-Thr(B30)-Insulin, während Spaltung an Arginin(B22) zu Des-(B23-30)-Insulin – ähnlich wie bei der Semisynthese – aus offenbar sterischen Gründen praktisch nicht stattfindet.

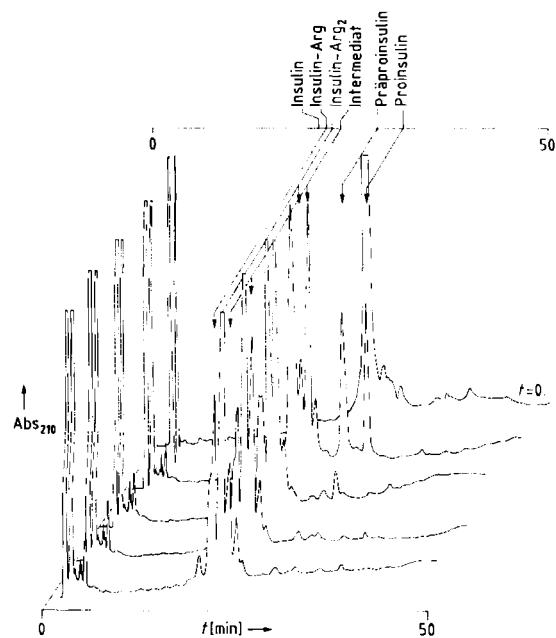


Abb. 10. Chromatogramme der HPLC-Trennungen von Proben einer Umsetzung von gefaltetem Präproinsulin mit Trypsin nach verschiedenen Reaktionszeiten; HPLC-System: Waters-Rad-Pak-C-18, 5 μm , Puffer, Gradient und sonstige Bedingungen wie in Abbildung 4.

Die Trennung von Des-Thr(B30)-Insulin, Humaninsulin-Arg₂ und Humaninsulin durch RP-HPLC ist in starkem Maße davon abhängig, ob Perchloration im Eluens ist oder nicht. Bei Verwendung von Triethylammoniumphosphat-Lösungen ohne Perchloration als mobile Phase (Abb. 11) ist die Reihenfolge der Elution dieser Spezies umgekehrt wie bei Verwendung des Tetraethylammoniumphosphatsystems mit Perchloration (Abb. 10). Eine HPLC-Trennung des Produktgemisches der Spaltung von gereinigtem Humaninsulin-Arg₂ mit Carboxypeptidase B mit dem perchlorationfreien Triethylammoniumphosphatsystem (Abb. 11) ergibt deutlich schlechtere Peakschärfen (siehe auch Abschnitt 3.4).

4.3. Reinheitsbeurteilung und Qualitätskontrolle

Um eine optimale Verträglichkeit und minimale Antigenität zu gewährleisten, sind alle heute therapeutisch eingesetzten Insuline von hoher Reinheit. 1925, wenige Jahre nach der Entdeckung von Insulin, therapierte man mit einem Material von 5 Einheiten pro mg, 1935 waren es etwa 20 Einheiten/mg, und hochreines Insulin hat heute 28 Ein-

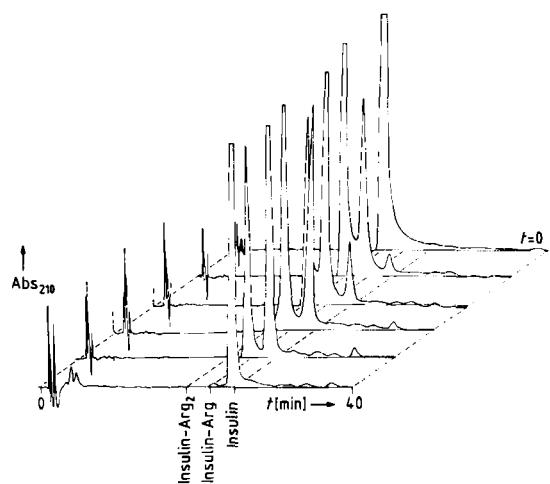


Abb. 11. Chromatogramme der HPLC-Trennungen von Proben einer Umsetzung von Humaninsulin-Arg₂ mit Carboxypeptidase B nach verschiedenen Reaktionszeiten. HPLC-System: Waters-Rad-Pak-C-18, 5 μm ; Puffer A: 0.25 M Triethylammoniumphosphat, 20% Acetonitril, pH=3; Puffer B: 0.25 M Triethylammoniumphosphat, 50% Acetonitril, pH=3; Gradient von 19% B bis 32% B in 40 min, 1.5 mL/min, 35°C.

heiten/mg. Fremdproteine sind im Endprodukt durchweg im ppm-Bereich oder darunter; sie sind nur durch Radioimmunoassay nachweisbar. Gleiches gilt für Proinsulin, das durch Gelchromatographie und Ionenaustauschchromatographie sehr effektiv abgetrennt wird. Die Ionenaustauschchromatographie (Abb. 12) liefert ein Produkt, das darüber hinaus von Insulinderivaten, die bei der Herstellung und Lagerung entstehen, weitgehend frei ist. So werden beispielsweise unter den sauren Bedingungen der Ethanolextraktion die Säureamidgruppen von Asparagin-

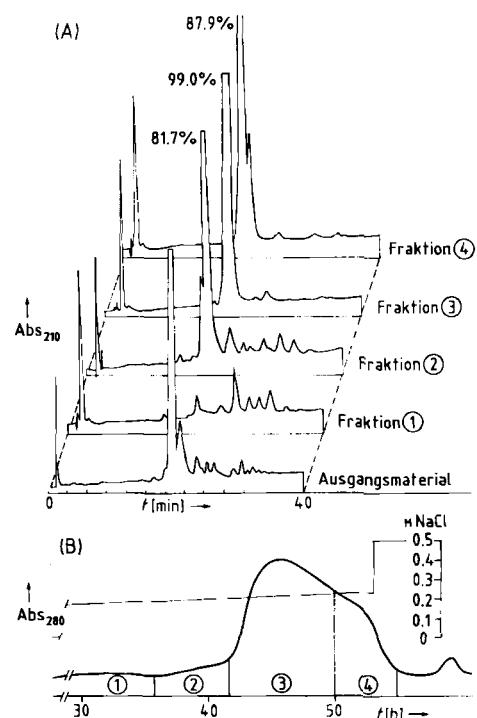


Abb. 12. Ionenaustauschchromatographie von rohem, semisynthetischen Humaninsulin (B) und HPLC-Analytik der einzelnen Fraktionen (A). Die Bedingungen der Ionenaustauschchromatographie an Diethylaminoethyl-(DEAE)-Träger mit einem detergenshaltigen Laufmittel und einem Kochsalzgradienten sind in [192] beschrieben. Bedingungen für die HPLC wie in Abbildung 4 beschrieben.

resten, insbesondere die von Asn(A21) zu Aspartat hydrolysiert – die Desamidoinsuline^[209] und ihre Ethylester entstehen.

Die HPLC erlaubt die Identifizierung der einzelnen Produkte und ermöglicht die Gewinnung hochreiner Fraktionen (Abb. 12). Sie dient gleichermaßen der Qualitätsprüfung für die Reinsubstanz (z. B. hinsichtlich Speziesidentität) und das fertige Arzneimittel sowie der Kontrolle der Haltbarkeit bei verschiedenen Temperaturen und über mehrere Jahre.

Die Gelfiltrations-HPLC wird heute routinemäßig ebenfalls für die Qualitätskontrolle und Haltbarkeitsuntersuchung herangezogen (Abb. 13); mit ihr sind „hochmolekulare“ Insulinderivate, wie etwa durch Transamidierung entstandene Dimere, nachweisbar. Für die Therapie dürfen nur hochreine Insuline verwendet werden, beispielsweise muß der Proinsulinanteil kleiner als 10 ppm sein, und der Anteil hochmolekularer Derivate muß unter 1% liegen^[210].

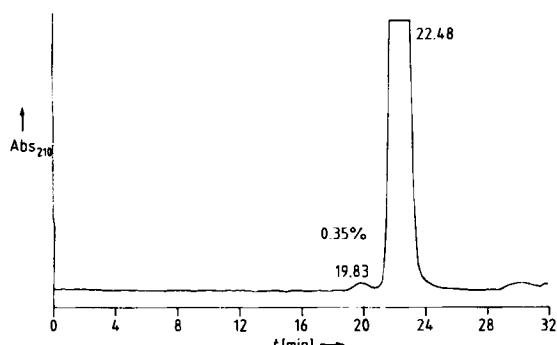


Abb. 13. Gelfiltrations-HPLC einer Probe von gentechnisch hergestelltem Humaninsulin-Arg. HPLC-Bedingungen: TSK-G-2000-SW-Säule; mobile Phase: 20% Essigsäure, 30% Acetonitril, 50% Wasser, 0,7 mL/min, Raumtemperatur, Probenmenge 200 µg.

Ein etwas komplizierteres analytisches Problem ist der Nachweis der Abwesenheit von Schweineinsulin in semisynthetischem Humaninsulin. Zwar lassen sich Human- und Schweineinsulin durch HPLC trennen, aber Desamido(A21)-Humaninsulin, das eine Begleitsubstanz sein kann, wird mit Schweineinsulin eluiert. Der Nachweis gelingt aber auf der Vorstufe des Humaninsulinesters^[199], oder aber durch S.-aureus-Protease-V8-Fingerprint. Ist Schweineinsulin im Humaninsulin, so wird Fragment III (Abb. 8) einen kleinen Nachpeak aufweisen, ist dagegen Desamido(A21)-Humaninsulin zugegen, so wird bei Fragment II dieser Nachpeak auftreten (Abb. 14).

4.4. Stabilität von Insulin in Dosiergeräten

Die Pharmakokinetik von Insulin ist beim Gesunden sehr komplex; der Pankreas sezerniert kleine Dosen als Basalversorgung und große nach Glucoseaufnahme. Der Blutzuckerspiegel steigt dann zwar etwas, pendelt sich aber sehr schnell bei ca. 80 mg/dL ein. Die Substitutionstherapie mit subcutan appliziertem Insulin kann diesen Prozeß nur sehr unvollkommen imitieren. Als gute Einstellung gilt heute ein relativ gleichbleibender Blutzuckerspiegel von 150–200 mg/dL; ein solches Profil (Abb. 15 links) ist zudem nur möglich, wenn Präparat und Nahrungsaufnahme

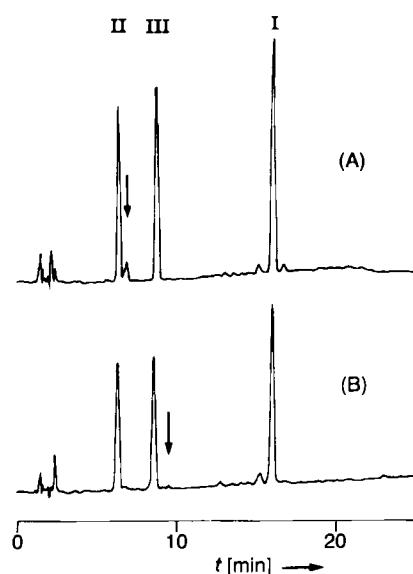


Abb. 14. Chromatogramme der HPLC-Trennung von S.-aureus-Protease-V8-Fragmenten von (A) Humaninsulin, verunreinigt mit Desamido(A21)-Humaninsulin, und (B) Humaninsulin, verunreinigt mit Schweineinsulin. HPLC-System wie in Abbildung 9 beschrieben.

gut aufeinander abgestimmt sind. Ständig erhöhte Blutzuckerwerte werden für diabetische Spätschäden zumindest mitverantwortlich gemacht^[211–213].

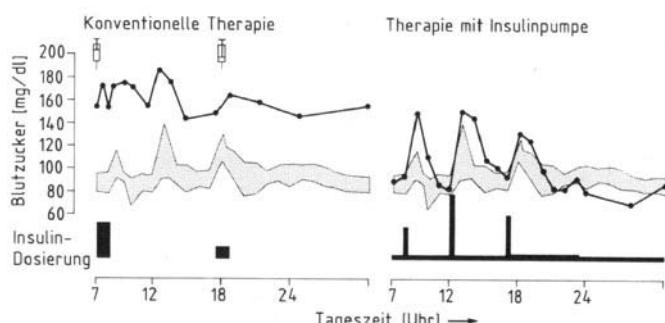


Abb. 15. Vergleich der mittleren Blutzuckerwerte von zwölf Typ-I-Diabetikern unter konventioneller Therapie mit Depot-H-Insulin Hoechst® (links, Prof. Skrabalo, Zagreb 1982) mit denen einer Patientengruppe unter Therapie mit einer externen Insulinpumpe (rechts, adaptiert von Rizza et al. [223]). Dunkel schattiert ist der Blutzuckerbereich beim gesunden Menschen.

Die Insulinausschüttung beim gesunden Menschen läßt sich mit einem Infusionssystem simulieren (Abb. 15 rechts). Solche Infusionssysteme sind heute in miniaturisierter Form in der klinischen Prüfung. Kommerziell erhältlich sind derzeit extern zu tragende Geräte, wobei das Insulin in der Regel über einen Katheter subcutan zugeführt wird^[214]; Implantate befinden sich noch in der Entwicklungsphase^[215]. Bei Implantaten wird das Insulin in die Bauchhöhle oder das Gefäßsystem abgegeben, und das Reservoir wird durch die Haut von Zeit zu Zeit nachgefüllt.

Schon früh bei der Entwicklung dieser Systeme trat jedoch ein gravierendes Problem auf: Insulin ist in Dosiersystemen in neutraler Lösung nicht stabil; innerhalb weniger Tage fällt denaturiertes, biologisch inaktives Insulin aus^[216, 217].

Physikalisch – das heißt gegen Denaturierung – vergleichsweise stabil sind saure ($\text{pH} = 3$) Insulinlösungen. Unter den Bedingungen in Implantaten bildet sich aber innerhalb eines Nachfüllzyklus von drei Wochen eine Reihe von modifizierten Produkten, so daß schließlich natives Insulin nurmehr in Spuren vorhanden ist. Dies ließ sich durch HPLC leicht analysieren (Abb. 16). Die Stabilität von Insulin in saurem Milieu in Dosiergeräten war demnach für die Humananwendung nicht ausreichend^[218].

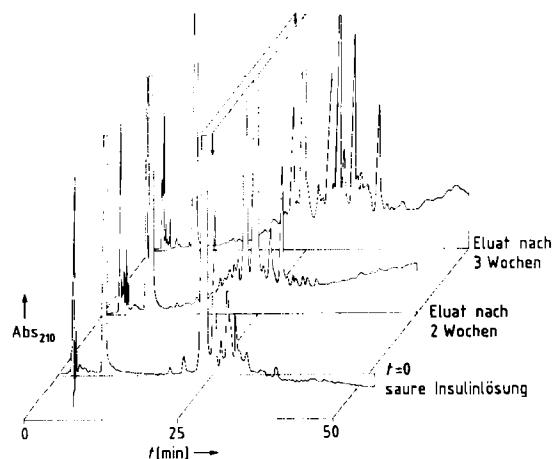


Abb. 16. Chromatogramme von HPLC-Trennungen einer sauren Schweineinsulinlösung ($\text{pH} = 3$) bei der Nachfüllung und nach Passage durch eine implantierbare Insulinpumpe bei einer Dosierung von $240 \mu\text{L}/\text{Tag}$, bei konstanter Schüttelbewegung und bei 37°C , nach 0, 2 und 3 Wochen. Desamido(A21)-Insulin (bei 25 min Retentionszeit) ist bei $t = 0$ in geringer Menge enthalten (Pfeil), während natives Insulin nach drei Wochen auf Kosten einer Vielzahl von Derivaten stark abgenommen hat (Pfeil). HPLC-System wie in Abbildung 4 beschrieben.

Die Adsorption an hydrophoben Oberflächen kann als der Initialschritt zur Denaturierung von Proteinen angesehen werden^[219]. Durch einen kleinen Anteil einer grenzflächenaktiven Substanz läßt sich auch im neutralen Medium die Adsorption von Insulin verhindern^[219, 220]. Eine derart stabilisierte Insulinlösung ist nicht nur physikalisch, sondern wegen des neutralen Milieus auch chemisch vergleichsweise stabil. Die HPLC-Untersuchungen zeigten, daß Insulin bei 37°C durch eine Pumpe gefördert nur we-

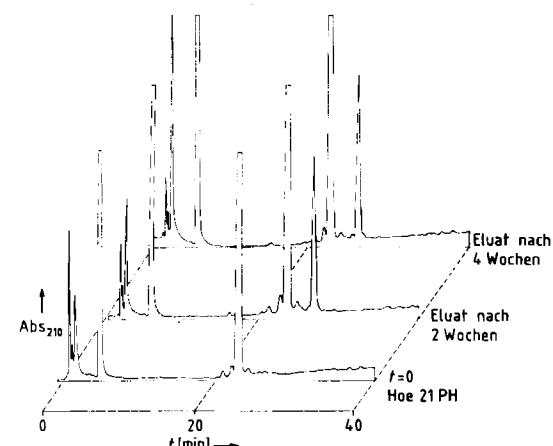


Abb. 17. Chromatogramme von HPLC-Trennungen einer stabilisierten, neutralen Humaninsulinlösung (Hoe 21 PH) unter den gleichen Test- und Analysebedingungen wie in Abbildung 16 beschrieben.

nig mehr Veränderungen erfährt als dies unter den erhöhten Temperaturen allein der Fall wäre (Abb. 17). Es entsteht dabei ein spezifisches Derivat, das in der HPLC bei einer Retentionszeit von 1.25 relativ zu Insulin eluiert. Dieses Produkt wurde durch präparative HPLC mit einem Butanol-Ethanol-Wasser-System^[208] isoliert; es ist ein monomeres Insulinderivat, das im *N*-terminalen Bereich der B-Kette, möglicherweise an B3^[221], modifiziert ist; es hat volle biologische Wirksamkeit und eine niedrige Antigenität^[222].

5. Weitere analytische und semipräparative Anwendungen der HPLC in der Proteinchemie

Nach dem heutigen Stand der Technik sind alle konventionellen säulenchromatographischen Methoden in die HPLC-Version übertragbar; Säulenmaterialien und Pumpen lassen auch Puffersysteme zu, wie sie bei der Gelfiltrations-, der Ionenaustausch- (Abb. 18), der Hydrophob- (Abb. 19) oder der Affinitätschromatographie (Abb. 20)

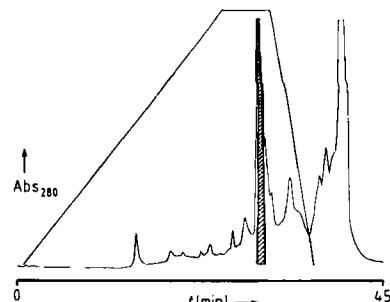


Abb. 18. Ionenaustauschchromatographie von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Bakterienextrakt ($300 \mu\text{g}$). Bedingungen: Protein-Pak-DEAE-5PW, $7.5 \text{ mm} \times 7.5 \text{ cm}$ (Waters); linearer Gradient von 0.02 M Tris-HCl, $\text{pH}=8.5$ auf 0.02 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, $\text{pH}=8.5$ in 25 min; $5 \text{ mL}/\text{min}$, Detektion bei $\lambda=280 \text{ nm}$; 0.1 Absorption Units Full Scale. Die Aktivität wurde zu 100%, die Proteinmenge zu 81% wiedergewonnen. (Mit Genehmigung von Millipore-Waters, Eschborn.)

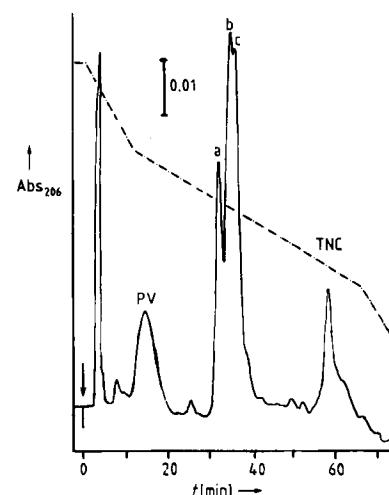


Abb. 19. Trennung verschiedener Ca^{2+} -bindender Proteine durch Hydrophobchromatographie. Bedingungen: TSK-Phenyl-5PW 7.5 mm \times 7.5 cm (LKB), Gradient von 1.5 M Na_2SO_4 in 0.1 M Phosphatpuffer, $\text{pH}=7$, 1 mM Ca^{2+} in 0.1 M Phosphatpuffer, $\text{pH}=7$, 1 mM Ca^{2+} in 74 min in der eingezeichneten (---) Form; $0.75 \text{ mL}/\text{min}$, Detektion bei $\lambda=206 \text{ nm}$. Die Wiedergewinnungsrate der einzelnen Proteine betrug mehr als 90%. (Aus [258] mit Genehmigung von Academic Press.)

angewendet werden. Die erreichbare Auflösung gleicht in vielen Fällen durchaus der von elektrophoretischen Verfahren; dabei ist man jedoch nicht auf Größen- oder Ladungsdifferenzen als Trennprinzip beschränkt. Zusätzlich ist der nahtlose Übergang in den semipräparativen Maßstab mit problemloser Wiedergewinnung und – mit Ausnahme der Gelfiltration – die Anreicherung aus sehr verdünnten Lösungen möglich.

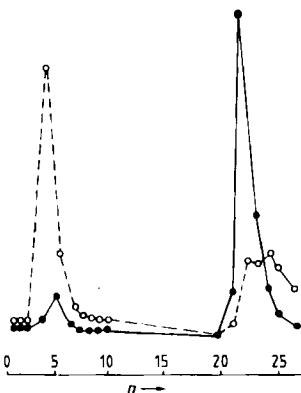


Abb. 20. Affinitätschromatographie von Acetylcholin-Esterase (AChE) aus Rohextrakt (1 mL). n = Fraktionszahl. Bedingungen: Ultraaffinitätsäule, 4.6 mm \times 5.0 cm (Beckman), derivatisiert mit Procainamid (8 mg); Beladung mit 0.1 M Kaliumphosphat, pH = 7.0; Elution mit 0.1 M Decamethoniumsalz in 0.1 M Kaliumphosphat, pH = 7.0; 0.15 mL/min, Detektion bei λ = 280 nm (O—O) und AChE-Aktivität (●—●). Fünffache Anreicherung mit 75proz. Wiedergewinnung in 2.5 h. (Mit Genehmigung von Beckman Instruments, München.)

Ein gutes Beispiel hierfür ist die Isolierung des Colony Stimulating Factors (CSF) aus menschlichem Urin durch HPLC über Hydrophobchromatographie^[224]. Thymosin β 4 ließ sich nach grober Voranreicherung und anschließende RP-HPLC in Zellkulturextrakten nachweisen^[146]. Üblicherweise werden mehrere Trennprinzipien kombiniert; die direkte Gewinnung von Inhibin aus Follikelflüssigkeit gelang durch Gelfiltration und RP-HPLC^[225], und zur Reindarstellung von γ -Interferon erwiesen sich Ionenaustauschchromatographie und RP-HPLC als gut geeignet^[226]. Semipräparative Trennungen sind ein Hilfsmittel zur Charakterisierung von Proteinen. Schnelligkeit, Sicherheit und Empfindlichkeit der Sequenzanalyse von Proteinen wurden durch HPLC-Methoden entscheidend verbessert. Die Primärstruktur von Proteinen lässt sich heute mit Mikrogrammengen ohne weiteres bestimmen, die durch HPLC in idealer Weise zugänglich sind^[18, 23, 227].

Schwierig ist die Bearbeitung membrangebundener Proteine; hier werden selten die Auflösungen erreicht, die man von leicht wasserlöslichen Proteinen gewohnt ist. Die erfolgreiche Anwendung der Ionenaustauschchromatographie in Gegenwart nichtionischer oder zwitterionischer Detergentien wurde beschrieben^[228, 229]. Durch derart schonende Trennbedingungen wird die Antigenität der Proteine erhalten^[230]. Dies ist bei der Isolierung viraler Proteine von besonderer Bedeutung; sie dient der Gewinnung von Antisera zur Erkennung von Virusinfektionen oder der Entwicklung künstlicher Impfstoffe^[231, 232]. Es zeigte sich allerdings auch, daß Proteine, die unter drastischen RP-HPLC-Bedingungen isoliert worden waren, zwar nicht mehr von Antikörpern gegen die native Struktur erkannt

wurden, ihrerseits aber als Antigene zur Erzeugung von Antisera gegen die nativen, viralen Proteine geeignet waren^[140, 231, 232].

Häufig genutzt wird die HPLC inzwischen auch zur Reinigung radioaktiv markierter Polypeptidhormone und Antikörper für radioimmunologische Bestimmungen. Die hohe Selektivität der RP-HPLC läßt sich für die Trennung der an verschiedenen Positionen markierten Moleküle und somit zur Reaktionsoptimierung, Abtrennung von Nebenprodukten und Isolierung einzelner Spezies nutzen^[233, 234]. Hierdurch wird eine hohe spezifische Aktivität und Stabilität erreicht. Die Reinigung von Antikörpern kann durch Chromatographie über Hydroxyapatit^[167], durch Hydrophobchromatographie^[49], durch Ionenaustauschchromatographie allein^[235] oder in Kombination mit der Gelfiltration^[236] gleich effektiv durchgeführt werden.

Die rein analytischen Anwendungen der Protein-HPLC sind noch wenig verbreitet. So sind lediglich für Insulin in den Vorschriften des neuesten Europäischen Arzneibuchs auch HPLC-Methoden eingeschlossen. Dies wird sich jedoch mit Sicherheit ändern, wenn durch die Gentechnologie eine Reihe neuer, pharmazeutisch nutzbarer Polypeptide oder Proteine verfügbar wird. Das Beispiel Insulin zeigt, welche Möglichkeiten die HPLC mit der Trennung aufarbeitungsbedingter Mikroheterogenitäten für die Prozeßoptimierung und Qualitätskontrolle bietet.

Auch im diagnostischen Bereich sind die Möglichkeiten bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Interessante Beispiele sind die Identifizierung anormaler Insuline und Proinsuline in hyperinsulinämischen Patienten^[183, 237], die Analyse genetisch bedingter Hämoglobin-Varianten^[238, 239], die Charakterisierung der durch Stoffwechselentgleisung hervorgerufenen glykosylierten Hämoglobine^[240], die Auftrennung von Rezeptor-Isoformen^[241] und die Bestimmung von Immunglobulin E im Serum durch Affinitätschromatographie^[242]. Bestimmte Isoformen von Transferasen können mit Myocardinfarkt in Zusammenhang gebracht werden^[243]; in Seren von Krebspatienten wurden durch HPLC spezifische Wachstumsfaktoren gefunden^[244]. Beim qualitativen Serum-Screening ist die Elektrophorese mit ihrem hohen Probendurchsatz unschlagbar; bei der HPLC ist man jedoch unabhängig von der Probenkonzentration, und die HPLC ist besonders bei quantitativen Analysen von Vorteil^[239, 240, 242].

6. Präparative Trennung von Proteinen durch HPLC

Großporige Kieselgele mit geringer Kohlenstoffbelegung^[92, 93, 115, 116, 119–122, 245] sind eine der Grundvoraussetzungen für préparative RP-HPLC. Als besonders geeignet für die préparative Trennung von Proteinen hat sich das TP-Material von Vyac (TP=totally porous) erwiesen^[17, 246]. Durch die geringe Kohlenstoffbelegung und Restabsättigung von Silanolgruppen durch „double bonding“, d. h. Nachderivatisierung mit niedermolekularen Liganden, ermöglicht es selektive Trennungen; trotz geringerer Kapazität sind die erreichbaren Ausbeuten gut. Die sphärischen Partikel (Durchmesser 15–20 μm) lassen sich gerade noch trocken packen, so daß mit radialkomprimierbaren Kunststoffkartuschen und diesem Material ein simples, aber effizientes Trennsystem erhalten wird.

Für präparative Zwecke werden vor allem flüchtige Puffer als Eluens eingesetzt. Mit großem Erfolg wird überwiegend das Trifluoressigsäure/Acetonitril-System verwendet^[17, 127, 136]; es führt durch den Gegenioneneffekt zu scharfen Peaks, und die Produkte können nach Gefrier-trocknung salzfrei erhalten werden. Empfindlichere Proteine können mit Pyridin/Essigsäure oder Pyridin/Ameisensäure^[26, 247] bei pH 4–5 getrennt werden. Auch hier können die Proteine salzfrei isoliert werden. Zwar hat sich Acetonitril als Elutionsmittel bestens bewährt (scharfe Peaks), doch in immer größerem Ausmaß werden das weniger giftige, in der Elutionskraft stärkere Propanol und Mischungen aus Propanol und Butanol eingesetzt^[25, 115, 166], um die Belastung des Proteins mit denaturierender organischer Phase möglichst klein zu halten. Am Beispiel von Interleukin 2 soll gezeigt werden, daß eine analytische Trennung direkt in den präparativen Maßstab übertragen werden kann.

6.1. Interleukin 2

Interleukin 2 (IL-2) ist eines der immunologisch aktiven Proteine, die, wie z. B. γ -Interferon, Interleukin 1 und CSF, jetzt aufgrund der Fortschritte in der Gentechnik größte Aufmerksamkeit genießen. Seine Bedeutung liegt in der zentralen Rolle, die es im Immunsystem während einer Immunreaktion spielt (Abb. 21). IL-2 ist der Proliferations-

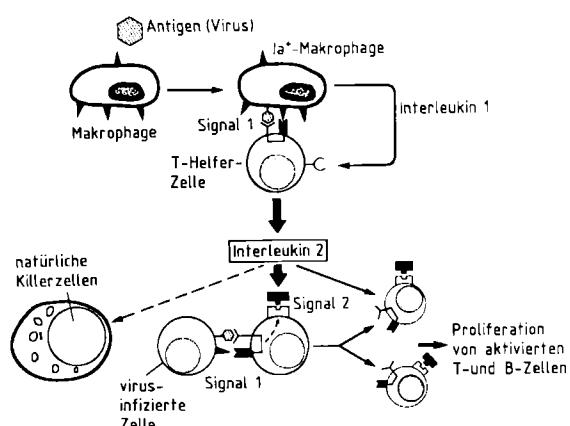


Abb. 21. Rolle von Interleukin 2 im Immunsystem während einer Immunreaktion. Modifiziert nach [259].

faktor, der für die Vermehrung der aktivierten T- und B-Lymphocyten – Blutzellen, die für die spezifische Immunreaktion verantwortlich sind – nötig ist. Kommt der Körper mit einem Antigen, z. B. mit einer virustransformierten Zelle oder Bruchstücken davon, in Berührung, so wird dieses Antigen zuerst von den Makrophagen beseitigt. Diese verdauen das Antigen und exprimieren Teile hiervon zusammen mit anderen notwendigen Erkennungsproteinen an ihrer Oberfläche. Gleichzeitig schütten sie ein Signalprotein, Interleukin 1, aus, das die Lymphocyten aktiviert. Durch Interleukin 1 und das Antigen an der Makrophagen-Oberfläche werden die für dieses Antigen spezifischen T-Helfer-Lymphocyten aktiviert; sie reagieren mit der Ausschüttung einer Reihe von Botenstoffen. Dazu gehört Interleukin 2, das an die Lymphocyten bindet, die nach Aktivierung durch Antigen und Interleukin 1 den Rezeptor

für Interleukin 2 exprimieren. Die Bindung von IL-2 an den Rezeptor induziert die Zellteilung, die sich solange wiederholt, wie IL-2 präsent ist, d. h. von T-Helfer-Zellen ausgeschüttet wird.

Die durch IL-2 eingeleitete Zellteilung verstärkt die spezifische Abwehrreaktion des Immunsystems. Die Zahl der reaktiven Zellen wird um den Faktor 100–1000 angehoben. IL-2 ist als Immunstimulator für eine ganze Reihe von therapeutischen Anwendungen interessant. So zeigen Versuche am National Cancer Institute der USA, daß IL-2 auch zur Tumorbekämpfung eingesetzt werden kann^[248].

Humanes IL-2 wurde zuerst aus Überständen aktiverter Lymphocyten in Spuren angereichert und zum Teil auch über RP-HPLC gereinigt^[249–251]. Mit der Aufklärung der Nucleotidsequenz durch Taniguchi et al.^[252] wurde die gentechnische Herstellung möglich. Das Protein besteht aus 133 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 15000. Zwei der drei Cysteinreste bilden eine Disulfidbrücke^[253] (Abb. 22), die für die biologische Aktivität es-

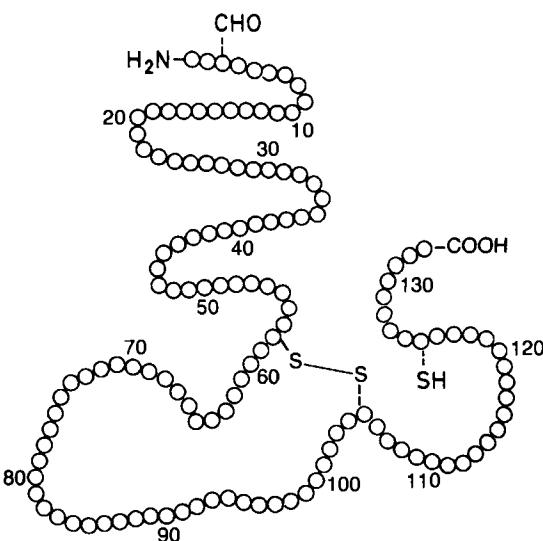


Abb. 22. Struktur von IL-2 mit der essentiellen Disulfidbrücke und der Glykosylierungsstelle (CHO).

sentiell ist. Humanes Interleukin 2 wurde in der Zwischenzeit von mehreren Gruppen kloniert und exprimiert^[252, 254, 255] und ist in therapeutischen Mengen verfügbar. Sowohl aus Hefe als auch aus *E. coli* konnte IL-2 gewonnen werden. Die spezifische Aktivität des natürlichen, an Thr3 glykosylierten Moleküls (Abb. 22) entspricht der von glykosyliertem IL-2 aus Hefe und von nicht glykosyliertem IL-2 aus *E. coli*. Daraus folgt, daß die Glykosylierung für die Aktivität nicht essentiell ist.

Die physikalischen Eigenschaften des nicht glykosylierten Proteins erschweren allerdings die Reinigung auf traditionellem Weg, denn in *E. coli* liegt das Protein als Aggregat in Einschlüssen vor. Es ist in herkömmlichen Puffern unlöslich und kann deshalb relativ leicht angereichert werden. Dies gelingt durch ein Waschen mit Puffern unterschiedlicher Ionenstärke mit und ohne Detergentien oder organischen Lösungsmitteln. Dadurch werden Fremdproteine und andere Zellbestandteile ausgewaschen, und IL-2 wird grob angereichert. Dieses Rohmaterial wird dann mit einem Gemisch aus Essigsäure und Alkoholen extrahiert. Solch ein Extrakt enthält bis zu 40% IL-2. Durch RP-

HPLC wird schließlich hochreines IL-2 erhalten; aufgrund der großen Hydrophobie von IL-2 wird das Protein erst nach allen Verunreinigungen eluiert.

Schon die ersten Versuche mit einer analytischen Säule und Trifluoressigsäure/Acetonitril als Eluens gaben hervorragende Trennungen und trotz der zur Elution notwendigen hohen Acetonitrilkonzentration keinen Memoryeffekt (nachträgliche Elution denaturiert gebundener Proteine in den nachfolgenden Gradientencyclen) durch präzipitiertes IL-2. Bei Rechromatographie von 20 µg IL-2 wurden ca. 18 µg eluiert, d.h. die Wiederfindungsrate beträgt etwa 90%.

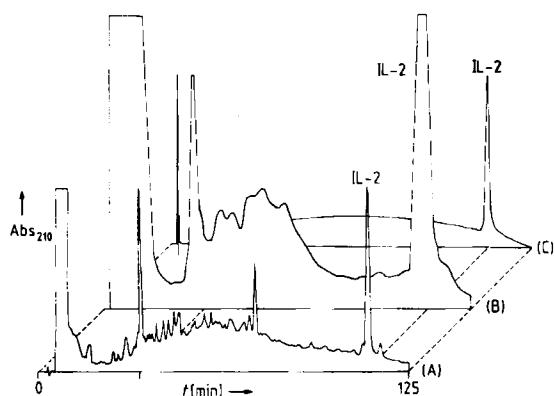


Abb. 23. Analytische und préparative HPLC-Trennung von gentechnisch mit *E. coli* gewonnenem IL-2. (A) Analytische Trennung eines Essigsäure/Butanol-Extrakts über eine Bioread-Hipore-C18-Säule (4.6 mm × 25.0 cm) mit Vorsäule; Eluens A: 0.1% Trifluoressigsäure/Wasser, Eluens B: 0.1% Trifluoressigsäure/80% Acetonitril in Wasser; Gradient von 35% B auf 85% B in 60 min, 1.5 mL/min, Detektion bei $\lambda = 210$ nm. (B) Préparative Trennung von etwa 60 mg IL-2 über eine radialkomprimierbare Waters-PrepPak-Kartusche (5.7 cm × 30.0 cm), gefüllt mit Vydac-TP218 (15–20 µm), 300 Å-Poren, Eluentiensystem und Gradient wie bei (A), 50 mL/min, Detektion über einen 1:50-Split. (C) Analytische Trennung der Hauptfraktion der préparativen Trennung; Trennbedingungen, Eluentiensystem wie bei (A). Die Basislinienkrümmung wird durch Überlappung eines $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs des freien Säure CF_3COOH mit dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang des Anions CF_3COO^- verursacht [257].

Die Bedingungen der analytischen Trennung wurden zuerst in den semipräparativen Maßstab (2cm-Säule) übertragen. Nach Optimierung von Durchflußgeschwindigkeit und Elutionsgradient konnten wir IL-2 in mg-Mengen isolieren. Für die préparative Trennung verwendeten wir radialkomprimierbare Kunststoffkartuschen des Formats 5.7 cm × 30.0 cm, gefüllt mit großporigem Vydac-Material. Trotz der größeren Partikel (15–20 µm) gelingt die Trennung von IL-2 auf solch einer Kartusche genauso gut wie auf der analytischen Säule (Abb. 23). Pro Lauf wurden etwa 60 mg hochreines, pyrogenfreies Interleukin 2 erhalten.

Es ist bekannt, daß sich bei einer Belegung von Kieselgel mit kürzeren Alkylketten wie C_3 , C_4 oder C_6 die Wiedergewinnungsrate von hydrophoben Proteinen bei der Chromatographie erhöhen kann. Die Proteine werden weniger stark gebunden, und oft reicht für die Elution ein geringerer Anteil organischer Phase. Die Vorteile der Belegung mit kürzeren Alkylketten konnten auch im Fall von IL-2 demonstriert werden. Auf C_{18} -Material sinkt nach einmaligem Überladen die Ausbeute beträchtlich. Nur nach einer Regeneration mit 60% Essigsäure/Guanidiniumhydrochlorid werden ursprüngliche Trenncharakteristik und Wiedergewinnungsraten erhalten. Demgegenüber ist das C_4 -Material relativ unempfindlich gegen Überladung.

Für préparative Routinerenigungen ist also das C_4 -Material dem C_{18} -Material vorzuziehen.

6.2. Andere Proteinreinigungen im préparativen Maßstab

Anders als bei IL-2, das durch préparative HPLC rein und hochaktiv erhalten werden kann, führen bei vielen anderen Proteinen die pH-Bedingungen, die organischen Eluentien und Adsorptionseffekte an der Umkehrphase zu Teilentfaltung und Denaturierung. Durch sorgfältige Wahl von stationärer Phase und Elutionssystem sowie Nachbehandlung der Fraktionen ist es jedoch auch möglich, Enzyme wie Trypsin und alkalische Phosphatase ohne Aktivitätseinbuße zu reinigen^[135, 256]. Beispielsweise ist eine Präparation von Trypsin, das an RP-18 gereinigt wurde, so weit frei von anderen proteolytischen Aktivitäten, daß es für hochselektive Peptidspaltungen, z.B. bei der Sequenzanalyse, eingesetzt werden kann.

Während sich die préparative Trennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht größer als 20 000 noch auf wenige Beispiele beschränkt, hat sich die Isolierung und Reinigung von Antikörpern mit einem Molekulargewicht von ca. 180 000 durch Ionenaustausch- und Hydroxyapatit-Adsorptionschromatographie im Hochdrucksystem durchgesetzt. Unter der Bezeichnung „MAPS“ ist ein komplettes System zur Reinigung monoklonaler Antikörper kommerziell erhältlich^[167].

7. Zusammenfassung und Ausblick

HPLC-Versionen aller konventionellen säulenchromatographischen Techniken wurden innerhalb der letzten Jahre für die Proteinchemie nutzbar gemacht. Dabei entstanden leistungsfähige Analysensysteme, die nun verstärkt in Anwendungsbereiche vordringen, die vorher eine Domäne von Elektrophoresemethoden waren. Liegen die Vorteile der Elektrophorese in der immens hohen Zahl möglicher Parallelanalysen (notwendig z.B. beim Serum-Screening), so imponiert die HPLC durch die Schnelligkeit der Einzelanalyse mit direkter Detektierbarkeit der Komponenten. Neu entwickelte Trägermaterialien aus extrem kleinen, nicht porösen Partikeln (< 2 µm) lassen noch weitere Verbesserungen erwarten. Die hochauflösenden Trennungen können auch préparativ durchgeführt werden. Hier geht die Entwicklung dahin, möglichst preiswerte stationäre Phasen mit größerem Korn anzubieten, die sich vom Anwender selbst in großen Säulen leicht packen und mit hoher Langzeitstabilität betreiben lassen.

Ein zentrales Thema ist die Frage der Biokompatibilität von stationärer und mobiler Phase. Gelfiltrations- und Ionenaustauschchromatographie werden unter annähernd physiologischen Bedingungen durchgeführt. Trennungen an Umkehrphasen bergen dagegen immer noch das Risiko der Proteindenaturierung in sich, auch wenn erhebliche Anstrengungen unternommen wurden, die Elutionsmittel, z.B. durch Verwendung von Detergentien, zu „entschärfen“. Derartige Problemlösungen sind in der Regel auf das jeweilige Protein zugeschnitten und selten direkt auf andere Trennungen übertragbar. Die Hydrophobchromatographie trennt nach ähnlichen Kriterien wie die RP-HPLC, aber prinzipiell unter schonenderen Bedingungen. Da-

durch wird eine hohe Wiedergewinnungsrate bei biologisch aktiven Proteinen erzielt. Auf diesem relativ jungen Gebiet ist daher noch mit wesentlichen Weiterentwicklungen zu rechnen.

Wir danken Dr. H. H. Schöne für sein Interesse an diesen Arbeiten und für hilfreiche Diskussionen. C. Müller und R. Lohfink danken wir für die Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts.

Eingegangen am 3. März 1986 [A 579]

- [1] A. J. P. Martin, R. L. M. Syngle, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358.
- [2] J. C. Giddings: *Dynamics of Chromatography*, Marcel Dekker, New York 1965.
- [3] H. Funke, *LaborPraxis* 8 (1984) 18.
- [4] L. R. Snyder, M. A. Stadalius, M. A. Quarry, *Anal. Chem.* 55 (1983) 1412A.
- [5] N. K. Boardman, S. M. Partridge, *Biochem. J.* 59 (1955) 543.
- [6] H. P. Jennissen, *J. Chromatogr.* 159 (1978) 71.
- [7] W. Kopaciewicz, M. A. Rounds, J. Fausnaugh, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 3.
- [8] X. Geng, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 15.
- [9] M. A. Stadalius, H. S. Gold, L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 31.
- [10] J. M. Di Bussolo, J. R. Gant, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 67.
- [11] M. Hermodson, W. C. Mahoney, *Methods Enzymol.* 91 (1983) 352.
- [12] J. Luiken, R. van der Zee, G. W. Welling, *J. Chromatogr.* 284 (1984) 482.
- [13] L. R. Snyder, J. J. Kirkland: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience, New York 1979.
- [14] L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.* 21 (1983) 65.
- [15] P. A. Bristow, J. H. Knox, *Chromatographia* 10 (1977) 279.
- [16] G. Vanecik, F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 109 (1980) 345.
- [17] J. D. Pearson, N. T. Lin, F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 124 (1982) 217.
- [18] J. W. Crabb, L. M. G. Heilmeyer, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 129.
- [19] R. M. Moore, R. R. Walters, *J. Chromatogr.* 317 (1984) 119.
- [20] F. E. Regnier, *Science* 222 (1983) 245.
- [21] M. A. Stadalius, M. A. Quarry, L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 93.
- [22] N. T. Miller, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 45.
- [23] E. C. Nice, C. J. Lloyd, A. W. Burgess, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 153.
- [24] R. van der Zee, G. W. Welling, *J. Chromatogr.* 325 (1985) 187.
- [25] K. J. Wilson, E. van Wieringen, S. Klauser, M. W. Berchtold, G. J. Hughes, *J. Chromatogr.* 237 (1982) 407.
- [26] R. V. Lewis, A. Fallon, S. Stein, K. D. Gibson, S. Udenfried, *Anal. Biochem.* 104 (1980) 153.
- [27] G. Vanecik, F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 121 (1982) 156.
- [28] K. A. Cohen, K. Schellenberg, K. Benedek, B. L. Karger, B. Grego, M. T. W. Hearn, *Anal. Biochem.* 140 (1984) 223.
- [29] W. Kopaciewicz, F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 133 (1983) 251.
- [30] S. C. Goheen, S. C. Engelhorn, *J. Chromatogr.* 317 (1984) 55.
- [31] F. E. Regnier, *Methods Enzymol.* 91 (1983) 137.
- [32] R. P. W. Scott: *Liquid Chromatography Detectors*, Elsevier, New York 1977.
- [33] C. J. R. Thorne in H. L. Kornberg (Hrsg.): *Techniques in Life Sciences, B104*, Elsevier, Amsterdam 1978, S. 1.
- [34] W. B. Gratzner in G. D. Fasman (Hrsg.): *Poly- α -amino acids, Biological Macromolecule Series*, Marcel Dekker, New York 1967, S. 177.
- [35] J. L. Di Cesare, *Chromatogr. Newslett.* 9 (1981) 16.
- [36] C. Y. Yang, H. J. Pownall, A. M. Gotto, *Anal. Biochem.* 145 (1985) 67.
- [37] L. Servillo, G. Colonna, C. Balestieri, R. Ragone, G. Itrace, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 251.
- [38] T. D. Schlabach, T. C. Wehr, *Anal. Biochem.* 127 (1982) 222.
- [39] G. Schwedt: *Chemische Reaktionsdetektoren für die schnelle Flüssigkeitschromatographie*, Hüthig Verlag, Heidelberg 1981.
- [40] J. R. Benson, *Anal. Biochem.* 77 (1976) 459.
- [41] P. Böhnen, S. Stein, J. Stone, S. Udenfried, *Anal. Biochem.* 67 (1975) 438.
- [42] H. Nika, *J. Chromatogr.* 297 (1984) 261.
- [43] G. K. Ackers, *Adv. Protein Chem.* 24 (1970) 343.
- [44] E. Pfannkoch, K. C. Lu, F. E. Regnier, H. G. Barth, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 430.
- [45] G. Guiochon, M. Martin, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 3.
- [46] T. V. Alfredson, C. T. Wehr, L. Tallman, F. Klink, *J. Liq. Chromatogr.* 5 (1982) 489.
- [47] M. Okazaki, Y. Ohno, I. Hara, *J. Chromatogr.* 221 (1980) 257.
- [48] Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 193 (1980) 311.
- [49] S. C. Goheen, R. S. Matson, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 235.
- [50] F. E. Regnier, R. Noel, *J. Chromatogr. Sci.* 14 (1976) 316.
- [51] H. Engelhardt, D. Matthes, *J. Chromatogr.* 142 (1977) 311.
- [52] Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 190 (1980) 297.
- [53] P. Roumeliotis, K. K. Unger, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 211.
- [54] R. W. Stout, J. J. De Stefano, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 63.
- [55] Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 193 (1980) 29.
- [56] Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 193 (1980) 458.
- [57] J. E. Rivier, *J. Chromatogr.* 202 (1980) 211.
- [58] B. S. Welinder in W. S. Hancock (Hrsg.): *Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. II*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984, S. 413.
- [59] F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 1.
- [60] O. Mikes, *Int. J. Pept. Protein Res.* 14 (1979) 393.
- [61] Y. Kato, K. Nakamura, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 294 (1984) 207.
- [62] T. Kadoya, T. Isobe, Y. Amano, Y. Kato, K. Nakamura, T. Okuyama, *J. Liq. Chromatogr.* 8 (1985) 635.
- [63] K. Nakamura, Y. Kato, *J. Chromatogr.* 333 (1985) 29.
- [64] J. Richey, *Am. Lab.* 14 (1982) 104.
- [65] L. Fägerstam, L. Söderberg, L. Wahlström, *Protides Biol. Fluids* 30 (1982) 621.
- [66] K. M. Gooding, M. N. Schmuck, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 139.
- [67] S. H. Chang, R. Noel, F. E. Regnier, *Anal. Chem.* 48 (1976) 1839.
- [68] A. J. Alpert, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* 185 (1979) 375.
- [69] S. Gupta, E. Pfannkoch, F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 128 (1983) 196.
- [70] Y. Kato, K. Komiya, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 246 (1982) 13.
- [71] Y. Kato, K. Nakamura, T. Hashimoto, *HRC & CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 8 (1985) 154.
- [72] C. Tanford, *Science* 200 (1978) 1012.
- [73] Z. Er-el, Y. Zaidenbaig, S. Shaltiel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 (1972) 383.
- [74] H. A. Arfmann, S. Shaltiel, *Eur. J. Biochem.* 70 (1976) 269.
- [75] S. Shaltiel, *Methods Enzymol.* 104 (1984) 69.
- [76] H. Engelhardt, D. Matthes, *Chromatographia* 14 (1981) 325.
- [77] Y. Kato, T. Kitamura, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 49.
- [78] J. L. Fausnaugh, E. Pfannkoch, S. Gupta, F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 137 (1984) 464.
- [79] N. T. Miller, B. Feibus, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* 316 (1984) 519.
- [80] D. L. Gooding, M. N. Schmuck, K. M. Gooding, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 107.
- [81] Y. Kato, T. Kitamura, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 292 (1984) 418.
- [82] Y. Kato, T. Kitamura, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 298 (1984) 407.
- [83] J. L. Fausnaugh, L. A. Kennedy, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* 317 (1984) 141.
- [84] W. R. Melander, D. Corradini, C. Horvath, *J. Chromatogr.* 317 (1984) 67.
- [85] W. R. Melander, C. Horvath, *Arch. Biochem. Biophys.* 183 (1977) 393.
- [86] R. H. Ingraham, S. Y. M. Lau, A. K. Taneja, R. S. Hodges, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 77.
- [87] G. A. Howard, A. J. P. Martin, *Biochem. J.* 46 (1950) 532.
- [88] R. E. Majors, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 488.
- [89] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *J. Chromatogr.* 125 (1976) 129.
- [90] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *Anal. Chem.* 49 (1977) 142.
- [91] C. Horvath, W. Melander, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 393.
- [92] W. S. Hancock, J. T. Sparrow in C. Horvath (Hrsg.): *High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives, Vol. 3*, Academic Press, New York 1983, S. 49.
- [93] M. T. W. Hearn, *Methods Enzymol.* 104 (1984) 190.
- [94] R. A. Barford, B. J. Sliwinski, A. C. Breyer, H. L. Rothbart, *J. Chromatogr.* 235 (1982) 281.
- [95] W. C. Mahoney, *Biochim. Biophys. Acta* 704 (1982) 284.
- [96] J. D. Pearson, W. C. Mahoney, M. A. Hermodson, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* 207 (1981) 325.
- [97] M. T. W. Hearn, B. Grego, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 125.
- [98] M. J. O'Hare, E. C. Nice, *J. Chromatogr.* 171 (1979) 209.
- [99] S.-J. Su, B. Grego, B. Niven, M. T. W. Hearn, *J. Liq. Chromatogr.* 4 (1981) 1745.
- [100] J. L. Meek, Z. L. Rossetti, *J. Chromatogr.* 211 (1981) 15.
- [101] T. Sasagawa, T. Okuyama, D. C. Teller, *J. Chromatogr.* 240 (1982) 329.
- [102] E. Keshavarz, S. Nakai, *Biochim. Biophys. Acta* 576 (1979) 269.
- [103] S. Terabe, H. Nishi, T. Ando, *J. Chromatogr.* 212 (1981) 295.
- [104] E. C. Nice, M. W. Capp, N. Cooke, M. J. O'Hare, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 569.
- [105] A. J. Sadler, R. Micanovic, G. E. Katzenstein, R. V. Lewis, C. R. Middaugh, *J. Chromatogr.* 317 (1984) 93.
- [106] K. Benedek, S. Dong, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* 317 (1984) 227.

- [107] A. R. Kerlavage, C. J. Weitzmann, T. Hasan, B. S. Cooperman, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 225.
- [108] S. A. Cohen, K. Benedek, S. Dong, Y. Tapuhi, B. L. Karger, *Anal. Chem.* 56 (1984) 217.
- [109] P. G. Stanton, B. Grego, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 189.
- [110] W. S. Hancock, C. A. Bishop, M. T. W. Hearn, *FEBS Lett.* 72 (1976) 139.
- [111] W. S. Hancock, C. A. Bishop, R. L. Prestidge, D. R. K. Harding, M. T. W. Hearn, *Science* 200 (1978) 1168.
- [112] Y. Kato, T. Kitamura, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* 333 (1985) 93.
- [113] Merkblatt: *Polymeric HPLC-columns for proteins and peptides*, Polymer Laboratories, 1985 (Latek GmbH).
- [114] F. V. Warren, B. A. Bidlingmeyer, *J. Liq. Chromatogr.* 8 (1985) 619.
- [115] R. V. Lewis, D. De Wald, *J. Liq. Chromatogr.* 5 (1982) 1367.
- [116] M. J. O'Hare, M. W. Capp, E. C. Nice, N. H. C. Cooke, B. G. Archer, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 17.
- [117] E. C. Nice, M. W. Capp, M. J. O'Hare, *J. Chromatogr.* 185 (1979) 413.
- [118] J. D. Pearson, F. E. Regnier, *J. Liq. Chromatogr.* 6 (1983) 497.
- [119] N. H. C. Cooke, B. G. Archer, M. J. O'Hare, E. C. Nice, M. W. Capp, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 115.
- [120] H. Engelhardt, H. Müller, *Chromatographia* 19 (1984) 77.
- [121] M. T. W. Hearn, B. Grego, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 541.
- [122] M. T. W. Hearn, B. Grego, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 61.
- [123] I. Molnar, C. Horvath, *J. Chromatogr.* 142 (1977) 623.
- [124] M. T. W. Hearn, B. Grego, W. S. Hancock, *J. Chromatogr.* 185 (1979) 429.
- [125] M. T. W. Hearn, *Adv. Chromatogr.* 18 (1980) 59.
- [126] W. S. Hancock, C. A. Bishop, L. J. Meyer, D. R. K. Harding, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* 161 (1978) 291.
- [127] W. C. Mahoney, M. A. Hermodson, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11199.
- [128] J. E. Rivier, *J. Liq. Chromatogr.* 1 (1978) 343.
- [129] J. B. Shelton, J. R. Shelton, W. A. Schröder, *J. Liq. Chromatogr.* 4 (1981) 1381.
- [130] U. Certa, G. von Ehrenstein, *Anal. Biochem.* 118 (1981) 147.
- [131] G. Szepesi, M. Gazdag, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 597.
- [132] M. Kehl, F. Lottspeich, A. Henschen, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 1501.
- [133] H. P. J. Bennett, C. A. Browne, S. Solomon, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 1353.
- [134] C. A. Browne, H. P. J. Bennett, S. Solomon, *Anal. Biochem.* 124 (1982) 201.
- [135] J. J. L'Italien, J. E. Strickler, *Anal. Biochem.* 127 (1982) 198.
- [136] K. Titani, T. Sasagawa, K. Resing, K. A. Walsh, *Anal. Biochem.* 123 (1982) 408.
- [137] H. P. Nick, R. E. H. Wettenhall, M. T. W. Hearn, F. J. Morgan, *Anal. Biochem.* 148 (1985) 93.
- [138] M. van der Rest, P. Fietzek, *Eur. J. Biochem.* 125 (1982) 491.
- [139] G. E. Gerber, H. G. Khorana, *Methods Enzymol.* 88 (1982) 56.
- [140] J. Heukeshoven, R. Dernick, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 91.
- [141] M. Rubinstein, *Anal. Biochem.* 98 (1979) 1.
- [142] B. N. Jones, R. V. Lewis, S. Pääbo, K. Kojima, S. Kimuro, S. Stein, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 1373.
- [143] M. Green, K. H. Brackmann, *Anal. Biochem.* 124 (1982) 209.
- [144] A. Fallon, R. V. Lewis, K. D. Gibson, *Anal. Biochem.* 110 (1981) 318.
- [145] K. J. Wilson, A. Honeyegger, R. P. Stölzel, G. J. Hughes, *Biochem. J.* 199 (1981) 31.
- [146] E. Hannappel, W. Leibold, *Proteins Biol. Fluids* 32 (1984) 1093.
- [147] B. Grego, G. S. Baldwin, J. A. Knessel, R. J. Simpson, F. J. Morgan, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* 297 (1984) 21.
- [148] G. E. Tarr, J. W. Crabb, *Anal. Biochem.* 131 (1983) 99.
- [149] S. W. Herring, R. K. Enns, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 249.
- [150] W. S. Hancock, J. D. Capra, W. A. Bradley, J. T. Sparrow, *J. Chromatogr.* 206 (1981) 59.
- [151] W. S. Hancock, J. T. Sparrow, *J. Chromatogr.* 206 (1981) 71.
- [152] R. J. Ferris, C. A. Cowgill, R. R. Traut, *Biochemistry* 23 (1984) 3434.
- [153] J. Spiess, J. E. Rivier, C. Rivier, M. Vale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6517.
- [154] W. Richter, P. Schwandt, *J. Neurochem.* 36 (1981) 1279.
- [155] M. W. Berchthold, K. J. Wilson, C. W. Heizmann, *Biochemistry* 21 (1982) 6552.
- [156] E. Rinderknecht, B. H. O'Connor, H. Rodriguez, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 6790.
- [157] B. Larsen, B. L. Fox, M. F. Burke, V. J. Hruby, *Int. J. Pept. Protein Res.* 13 (1979) 12.
- [158] J. A. Smith, M. J. O'Hare, *J. Chromatogr.* 299 (1984) 13.
- [159] H. Gazdag, G. Szepesi, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 603.
- [160] R. van der Zee, S. Welling-Wester, G. W. Welling, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 577.
- [161] A. R. Kerlavage, T. Hasan, B. S. Cooperman, *J. Biol. Chem.* 258 (1981) 6313.
- [162] G. S. Baldwin, B. Grego, M. T. W. Hearn, J. A. Knessel, F. J. Morgan, R. J. Simpson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5276.
- [163] M. P. Strickler, J. Kintzios, M. J. Gemski, *J. Liq. Chromatogr.* 5 (1982) 1921.
- [164] S. A. Cohen, K. Benedek, Y. Tapuhi, J. C. Ford, B. L. Karger, *Anal. Biochem.* 144 (1985) 275.
- [165] M. T. W. Hearn, A. N. Hodder, M. I. Aguilar, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 47.
- [166] J. P. Chang, W. R. Melander, C. Horvath, *J. Chromatogr.* 318 (1985) 11.
- [167] T. L. Brooks, A. Stevens, *Int. Lab.* 15 (1985) Nr. 9, S. 72.
- [168] S. van der Wal, J. F. K. Huber, *Anal. Biochem.* 105 (1980) 219.
- [169] R. R. Walters, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1099 A.
- [170] T. M. Phillips, W. D. Queen, N. S. Moore, A. M. Thompson, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 213.
- [171] S. Ohlson, L. Hansson, P. O. Larsson, K. Mosbach, *FEBS Lett.* 93 (1978) 5.
- [172] J. R. Sportsman, G. S. Wilson, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2013.
- [173] M. E. Robers, M. W. Adlard, G. Saunders, G. Holt, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 163.
- [174] A. Borchert, P. O. Larsson, K. Mosbach, *J. Chromatogr.* 244 (1982) 49.
- [175] C. R. Lowe, M. Glad, P. O. Larsson, S. Ohlson, D. A. P. Small, T. Atkinson, K. Mosbach, *J. Chromatogr.* 215 (1981) 303.
- [176] *Fast Affinity Chromatography* (Bulletin 5933) Beckman Instruments, San Ramon, CA (USA) 1985.
- [177] G. Wagner, F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 37.
- [178] T. W. Hutchens, H. E. Dunaway, P. K. Besch, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 247.
- [179] F. Sanger, H. Tuppy, *Biochem. J.* 49 (1951) 481.
- [180] F. Sanger, E. O. P. Thompson, *Biochem. J.* 53 (1953) 366.
- [181] G. Bentley, E. Dodson, G. Dodson, D. Hodgkin, D. Mercola, *Nature London* 261 (1976) 166.
- [182] A. McLeod, S. P. Wood, *J. Chromatogr.* 285 (1984) 319.
- [183] H. S. Tager, *Diabetes* 33 (1984) 693.
- [184] B. S. Welinder, S. Linde in W. S. Hancock (Hrsg.): *Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984, S. 357.
- [185] E. P. Kroeff, R. E. Chance in J. L. Guerigan (Hrsg.): *Proc. of the FDA Workshop on Insulins, Growth Hormone and Recombinant DNA Technology*, The U. S. Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, USA 1982, S. 148.
- [186] B. S. Welinder, F. H. Andresen, *ibid.*, S. 163.
- [187] S. Linde, B. Hansen, O. Sonne, J. J. Holst, J. Gliemann, *Diabetes* 30 (1981) 1.
- [188] B. H. Frank, D. E. Peavy, C. S. Hooker, W. C. Duckworth, *Diabetes* 32 (1983) 705.
- [189] B. S. Welinder, S. Linde, B. Hansen, *J. Chromatogr.* 265 (1983) 301.
- [190] K. H. Joergensen, DBP 1940130 C2, Novo Terapeutisk Laboratorium (1983).
- [191] R. D. Cole, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18 (1959) 206.
- [192] M. Zoltobrocki, DBP 2659568 C3, Hoechst AG (1981).
- [193] W. Burgermeister, F. Enzmann, H. H. Schöne in A. Hasselblatt, F. von Bruchhausen (Hrsg.): *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Springer, Berlin 1975, S. 715.
- [194] D. V. Goeddel, D. G. Kleid, F. Bolivar, H. C. Heyneken, D. G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura, A. D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 106.
- [195] R. E. Chance, E. P. Kroeff, J. A. Hoffmann in J. L. Guerigan (Hrsg.): *Insulins, Growth Hormone and Recombinant DNA Technology*, Raven Press, New York 1981, S. 71.
- [196] I. S. Johnson, *Science* 219 (1983) 632.
- [197] F. Wengenmeyer, *Angew. Chem.* 95 (1983) 874; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 842.
- [198] J. Fruton, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 53 (1982) 239.
- [199] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könecke, *Angew. Chem. 97* (1985) 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 85.
- [200] a) R. Obermeier, G. Seipke, U. Grau in K. G. Petersen, K. J. Schlüter, L. Kerp (Hrsg.): *Neue Insuline*, Freiburger Graphische Betriebe, Freiburg 1982, S. 32; b) J. Markussen, *ibid.* S. 38.
- [201] R. Obermeier, G. Seipke, *Process Biochem.* 19 (1984) 29.
- [202] J. D. Young, F. H. Carpenter, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 743.
- [203] D. F. Steiner, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 30 (1967) 60.
- [204] D. F. Steiner, J. L. Clark, C. Nolan, A. H. Rubenstein, E. Margoliash, B. Aten, P. E. Oyer in S. Baba, T. Kaneko, N. Yanaihara (Hrsg.): *Pro-insulin, Insulin, C-Peptide*, Excerpta Medica, Amsterdam 1979, S. 267.
- [205] J. M. Swan, *Nature London* 180 (1957) 643.
- [206] G. H. Dixon, A. C. Wardlaw, *Nature London* 188 (1960) 721.
- [207] B. H. Frank, *Eur. Pat.-Anm.* 0037255, Eli Lilly (1981).
- [208] U. Grau, *Diabetes* 34 (1985) 1174.
- [209] F. H. Carpenter, A. Crambach, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 404.
- [210] *United States Pharmacopeia*, 21st Revision, U. S. Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, USA 1985, S. 536.
- [211] H. Ross, G. Bernstein, H. Rifkin in M. Ellenberg, H. Rifkin (Hrsg.): *Diabetes Mellitus, Theory and Practice*, Medical Examination Publishing Corp., New York 1983, S. 907.
- [212] M. Brownlee, H. Vlassara, A. Cerami, *Ann. Intern. Med.* 101 (1984) 527.

- [213] P. Rastein in M. Ellenberg, H. Rifkin (Hrsg.): *Diabetes Mellitus, Theory and Practice*. Medical Examination Publishing Corp., New York 1983, S. 941.
- [214] J. C. Pickup, D. Rothwell, *Med. Biol. Eng. Comput.* 22 (1984) 385.
- [215] K. Irsigler, H. Kritz, R. Lovett (Hrsg.): *Diabetes Treatment with Implantable Insulin Infusion Systems*. Urban und Schwarzenberg, München 1983.
- [216] K. Irsigler, H. Kritz, *Diabetes* 28 (1979) 196.
- [217] W. D. Lougheed, H. Woulfe Flanagan, J. R. Clement, A. M. Albisser, *Diabetologia* 19 (1980) 1.
- [218] U. Grau, *Diabetologia* 28 (1985) 458.
- [219] U. Grau in K. D. Hepp, R. Renner (Hrsg.): *Continuous Insulin Infusion Therapy. Experience from One Decade*. Schattauer, Stuttgart 1985, S. 33.
- [220] U. Grau, G. Seipke, R. Obermeier, H. Thurow in K. G. Petersen, K. J. Schlüter, L. Kerp (Hrsg.): *Neue Insuline*. Freiburger Graphische Betriebe, Freiburg 1982, S. 441.
- [221] J. Brange, L. Langkjaer, S. Havelund, E. Sørensen, *Diabetologia* 25 (1983) 143.
- [222] U. Grau, P. Jährling, noch unveröffentlicht.
- [223] R. A. Rizza, J. E. Gerich, M. W. Haymond, R. E. Westland, L. D. Hall, A. H. Clemens, I. J. Service, *N. Engl. J. Med.* 303 (1980) 1313.
- [224] P. V. Byrne, *J. Chromatogr.* 283 (1984) 459.
- [225] M. Dobos, H. G. Burger, M. T. W. Hearn, F. J. Morgan, *Mol. Cell. Endocrinol.* 31 (1983) 187.
- [226] D. Novick, D. G. Fischer, Y. Mory, M. Revel, M. Rubinstein, *Protides Biol. Fluids* 32 (1984) 1049.
- [227] M. W. Hunkapiller, J. E. Strickler, K. J. Wilson, *Science* 226 (1984) 304.
- [228] P. Lundahl, E. Greijer, H. Lindblom, L. G. Fägerstam, *J. Chromatogr.* 297 (1984) 129.
- [229] H. Ikigai, T. Nakae, Y. Kato, *J. Chromatogr.* 322 (1985) 212.
- [230] P. Lambotte, J. van Snick, T. Boon, *J. Chromatogr.* 297 (1984) 139.
- [231] G. W. Welling, G. Kroen, K. Slopsema, S. Welling-Wester, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 173.
- [232] R. van der Zee, G. W. Welling, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 377.
- [233] B. H. Frank, M. J. Beckage, K. A. Willey, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 239.
- [234] B. S. Welinder, S. Linde, B. Hansen, O. Sonne, *J. Chromatogr.* 298 (1984) 41.
- [235] J. R. Deschamps, J. E. K. Hildreth, D. Deer, J. T. August, *Anal. Biochem.* 147 (1985) 451.
- [236] M. J. F. Schmerr, K. R. Goodwin, H. D. Lehmkuhl, R. C. Cutlip, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 225.
- [237] S. Seino, A. Funakoshi, Z. Z. Fu, A. Vinik, *Diabetes* 34 (1985) 1.
- [238] T. H. J. Huismans, J. B. Wilson, *Protides Biol. Fluids* 32 (1984) 1029.
- [239] A. Kutlar, F. Kutlar, J. B. Wilson, M. G. Headlee, T. H. J. Huismans, *Am. J. Hematol.* 17 (1984) 39.
- [240] E. C. Toren, D. N. Vacik, P. B. Mockridge, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 207.
- [241] D. M. Boyle, R. D. Wiehle, N. A. Shahabi, J. L. Wittcliff, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 369.
- [242] T. M. Phillips, N. S. Moore, W. D. Queen, A. M. Thompson, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 205.
- [243] S. W. Rabbin, P. Desjarduis, *Clin. Chim. Acta* 138 (1984) 245.
- [244] E. S. Kimball, W. H. Bohn, K. D. Cockley, T. C. Warren, S. A. Sherwin, *Cancer Res.* 44 (1984) 3613.
- [245] L. E. Henderson, R. Sowder, S. Oroszlan in T. Liu, A. Schechter, R. Heinrikson, P. Condliffe (Hrsg.): *Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1981, S. 251.
- [246] J. E. Rivier, R. McClintock, R. Galyean, H. Anderson, *J. Chromatogr.* 288 (1984) 303.
- [247] H. J. Friesen, S. Stein, M. Evinger, P. C. Familietti, J. Moschera, J. Meienhofer, J. Shively, S. Pestka, *Arch. Biochem. Biophys.* 206 (1981) 432.
- [248] S. A. Rosenberg, M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettingshausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni, J. T. Vetto, C. A. Seipp, C. Simpson, C. M. Reichert, *N. Engl. J. Med.* 313 (1985) 1485.
- [249] K. Welte, C. Y. Wang, R. Mertelmann, V. Salvatore, S. P. Feldman, M. A. S. Moore, *J. Exp. Med.* 156 (1982) 454.
- [250] E. M. Kniep, B. Kniep, W. Grote, H. S. Conradt, D. A. Monner, P. F. Mühlradt, *Eur. J. Biochem.* 143 (1984) 199.
- [251] A. Godard, J. Naulet, M. A. Peyrat, H. Vie, J. F. Moreau, J. D. Bignon, J. P. Soullilou, *J. Immunol. Methods* 70 (1984) 233.
- [252] T. Taniguchi, M. Matsui, T. Fujita, C. Takaoka, N. Kashima, R. Yoshimoto, J. Hamuro, *Nature London* 302 (1983) 305.
- [253] R. J. Robb, R. M. Kutny, M. Panico, H. R. Morris, V. Chowdry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6486.
- [254] R. Devos, G. Plaetinck, M. Cheroute, G. Simons, W. Degrave, J. Tavernier, E. Remaut, W. Fiers, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 4307.
- [255] K. Kato, T. Yamada, K. Kawahara, H. Onda, T. Asano, H. Sugino, A. Kakinuma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130 (1985) 692.
- [256] M. P. Strickler, M. J. Gemski, B. P. Doctor, *J. Liq. Chromatogr.* 4 (1981) 1765.
- [257] G. Winkler, P. Wolschan, P. Briza, F. X. Heinz, C. Kunz, *J. Chromatogr.* 347 (1985) 83.
- [258] D. Guerini, J. Krebs, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 178.
- [259] H. Wagner, M. Röllinghoff, *Behring Inst. Mitt.* 67 (1980) 2.