



УДК 577.112.088.3:543.544

© 1993 г. В. Е. Ключниченко, А. Н. Вульфсон

## ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ ИНСУЛИН ЧЕЛОВЕКА II.\* ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РАЗРЕШЕНИЕ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Рассмотрены закономерности эксклюзионно-сорбционных взаимодействий инсулинсодержащих белков с сорбентом в соответствии с химической и пространственной структурой, выполненные на колонке TSK G 3000 SW в нативных и денатурирующих условиях. Изучены механизмы частичной сорбции линейных проинсулина и гибридного белка в неденатурирующих условиях и динамика образования SDS-белкового комплекса в денатурирующих условиях. Полученные результаты используются для ЭВЭЖХ-анализа основных и промежуточных продуктов практически на всех стадиях технологии получения генно-инженерного инсулина человека.

Эксклюзионная хроматография (ЭХ) — один из видов хроматографии, в котором разделение происходит в соответствии с размером молекул образца в растворе [2]. Эксклюзионная ВЭЖХ (ЭВЭЖХ) часто применяется для качественного и количественного анализа белков и пептидов как в широком [3, 4], так и узком [5] диапазонах молекулярных масс и может проводиться как в нативных [6], так и в денатурирующих [7, 8] условиях. При проведении с помощью ЭВЭЖХ качественного разделения белков необходимо учитывать многие факторы, такие, как концентрация и вязкость наносимого образца [2, 9], геометрические [4] и физико-химические [10, 11] параметры сорбентов, условия элюирования (пределы pH [12], температура [13], величина ионной силы раствора [14], концентрация органических модификаторов и денатурирующих агентов [15]), стабильность работы и коррозионная стойкость хроматографической системы [16].

Классическая ЭХ требует минимальных взаимодействий между насадкой колонки и разделяемыми веществами, однако на практике трудно достичь чисто эксклюзионного эффекта в разделении компонентов. Из-за широкого разнообразия химических структур, обычных для образцов белков, может возникать адсорбция в основном ионного, электростатического, гидрофобного и смешанного характера, что уменьшает чисто эксклюзионные влияния [17].

Ионно-эксклюзионные эффекты характерны для элюентов со слабой ионной силой ( $\mu < 0,1$ ), когда поверхность сорбента слабо заряжена (большинство эксклюзионных насадок колонок имеют слабо выраженные анионные свойства [17]) и образец, имеющий заряд того же знака, исключается из пор из-за электростатического отталкивания, а противоположного — задерживается в них. В последнем случае можно говорить об ионной инклюзии [14, 17, 18].

При увеличении ионной силы могут возникать внутримолекулярные электростатические эффекты отталкивания соседних карбоксильных групп вдоль полимерной цепи образца, что вызывает расширение и даже деполимеризацию молекулы [14].

К частичной адсорбции могут приводить водородные связи между поверхностью

\* Сообщение I см. [1].

насадки колонки и молекулами белка. В случаях белков большой молекулярной массы или способных к образованию агрегатов адсорбция может быть достаточно сильной из-за множественных контактов. Для ослабления водородных связей используются добавки в элюент гуанидингидрохлорида и мочевины [12].

Гидрофобно-гидрофильные взаимодействия составляют значительную часть всех неэсклюзивных эффектов и обычно могут быть уменьшены при добавлении в подвижную фазу денатурирующих агентов, органических модификаторов (таких, как спирты или гликоли [19], ацетонитрил [13, 20], муравьиная кислота и триэтилammонийфосфат) или аминокислот [21]. Денатурирующая подвижная фаза может быть использована для уменьшения различий в форме белков, для предотвращения их ассоциирования и для солюбилизации полипептидов, плохо растворимых в воде. Поэтому важно заметить, что гуанидингидрохлорид и SDS, связываясь с глобулярными белками и изменяя их природную конформацию, превращает их в гуанидиновые или SDS-белковые комплексы [6, 14], радиус гидратации которых — простая функция молекулярной массы.

Гораздо большие проблемы возникают, когда колонка одновременно анионная и гидрофобная. Увеличение ионной силы для уменьшения ионных взаимодействий может увеличивать гидрофобные эффекты, уменьшение ее может привести к обратному результату. Следует сказать, что разделение, выходящее за рамки классического механизма, не всегда плохо. Использование неполярных элюентов, которые увеличивают взаимодействия белков с ЭХ-колонкой, было эффективно при очистке интерферона [22] и других биополимеров [17].

Цель данной работы — изучение механизмов удерживания инсулинсодержащих белков в режиме элюирования через эксклюзивную колонку типа TSK G SW, выявление общих закономерностей эксклюзивно-сорбционных взаимодействий этих белков с носителем в соответствии с их пространственной и химической структурой в нативных и денатурирующих условиях. Полученные результаты используются для ЭВЭЖХ-анализа основных и промежуточных продуктов на многих стадиях технологии получения генно-инженерного инсулина человека [1]. Особую важность представляет анализ субстанции инсулина на содержание высокомолекулярных примесей [23, 24], образующихся из-за полимеризации и агрегирования молекул вещества в ходе его получения и при хранении [11].

Хотя диапазон молекулярных масс образующихся инсулинсодержащих белков и их производных составляет 6—17 кДа, в данной работе была использована колонка TSK G 3000 SW с размером пор 250 Å (диапазон разделения 2—100 кДа). Причин этого выбора несколько. Во-первых, среди разработанных ранее [14] и недавно представленных [25] эксклюзивных колонок для разделения белков этот тип наиболее стабилен и часто применяется [26]. Химическая структура сорбента детально не описана в литературе, однако известно, что это силикагель, частично дезактивированный химически связанным гидрофобным полистиролом [2, 27, 28], содержащим некоторое количество гидроксильных групп [29]. Во-вторых, хотя диапазон разделения этой колонки в нативных условиях 10—100 кДа [30], в денатурирующих условиях (SDS) [31, 32] молекулы белков имеют большие размеры из-за образования SDS-белковых комплексов [6] и диапазон разделения уменьшается до 2—70 кДа [33]. В-третьих, в образцах гибридного белка содержались небольшие примеси его димера и других олигомеров, разделение которых было желательным для проверки полученных закономерностей.

Таким образом, так как механизмы удерживания белков на сорбентах с одинаковым химическим покрытием, но с разными диаметрами пор несколько различаются [14], небольшое различие результатов, полученных на разных колонках, может исказить общую картину зависимостей удерживания. При элюировании всех инсулинсодержащих белков и их производных в различных условиях, но на одной колонке можно в тонкостях выявить закономерности разделения и пути его оптимизации.

Из-за многообразия элюирующих систем при обработке результатов удобнее

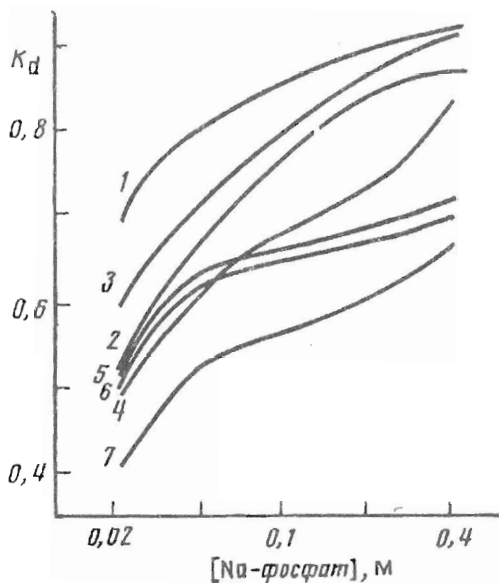


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость  $K_d$  инсулинсодержащих белков от концентрации Na-фосфатного буфера в качестве подвижной фазы. Колонка TSK G 3000 SW (0,75×30 см), скорость потока 0,5 мл/мин. 1 — инсулин, 2 — проинсулин, 3 — денатурированный проинсулин, 4 — проинсулин-S-сульфонат, 5 — линейный гибридный белок, 6 — ренатурированный гибридный белок, 7 — гибридный белок-S-сульфонат

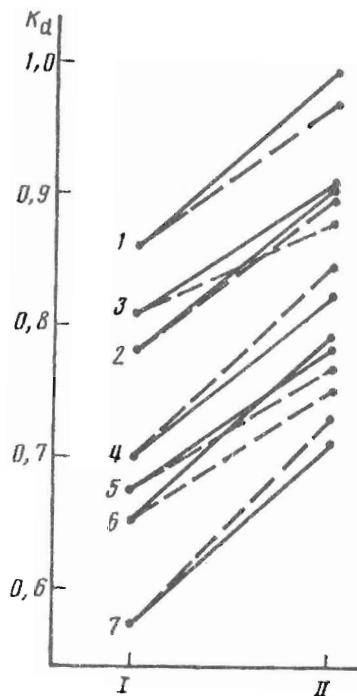


Рис. 2

Рис. 2. Изменение  $K_d$  инсулинсодержащих белков при добавлении в 0,1 M Na-фосфатный буфер 0,2 M NaCl или  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Линии (штриховые для NaCl и сплошные для  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) соединяют значения  $K_d$  соответствующих белков в отсутствие (I) и при добавлении солей (II). Условия и обозначения см. рис. 1

пользоваться значениями не времени или объема удерживания ( $V_i$ ), а коэффициента распределения ( $K_d$ ):

$$K_d = \frac{V_i - V_0}{V_e - V_0} = \frac{t_i - t_0}{t_e - t_0}$$

где  $V_i$  — объем элюции образца,  $V_0$  — свободный объем колонки,  $V_e$  — общий объем удерживания колонки,  $V_i - V_0$  — внутренний объем пор частиц колонки,  $t_i$  — время элюции образца,  $t_0$  — время элюции веществ, не проникающих в поры сорбента,  $t_e$  — время удерживания веществ, полностью проникающих в поры сорбента.

Разделение инсулинсодержащих белков в неденатурирующих условиях проводилось для изучения удерживания образцов на колонке в зависимости от ионной силы элюента и выполнялось при различных концентрациях Na-фосфатного буфера ( $0,04 < \mu < 0,8$ ) pH 7,0 (рис. 1), а также в 0,1 M Na-фосфате с добавлением 0,2 M NaCl (pH 7,0) или 0,2 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (pH 7,0) (рис. 2). Из рис. 1 видно, что, как и следует ожидать из классического механизма разделения, при увеличении ионной силы элюирующего раствора увеличивается значение  $K_d$ , однако характер удерживания разных белков различается. Кроме того, видно,

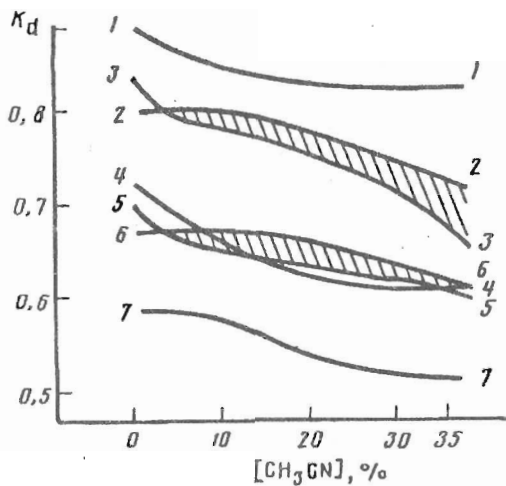


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость  $K_d$  инсулинсодержащих белков от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе (0,1 М Na-фосфат, pH 7,0). Условия и обозначения см. рис. 1

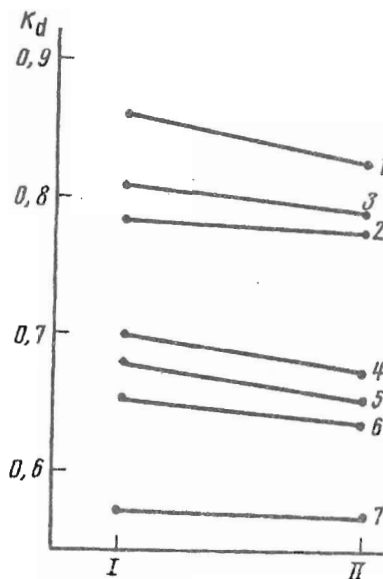


Рис. 4

Рис. 4. Изменение  $K_d$  инсулинсодержащих белков в присутствии 20% MeOH в подвижной фазе (0,1 М Na-фосфат, pH 7,0). Линии соединяют значения  $K_d$  соответствующих белков в буфере без метанола (I) и в присутствии 20% MeOH (II). Условия и обозначения см. рис. 1

что линейные проинсулин (3) и гибридный белок (5) элюируются позднее, чем их ренатурированные (т. е. «свернутые») аналоги (2) и (6), соответственно имеющие меньший размер в растворе, что является артефактом в эксклюзионной хроматографии. Вероятно, это происходит из-за взаимодействия насадки колонки с SH-группами или «открытыми» участками этих белков. При сульфитолизе этих групп происходит обратный ионоэкслюзионный процесс, в результате чего проинсулин-S-сульфонат (4) и гибридный белок-S-сульфонат (7) элюируются раньше своих не только линейных, но и ренатурированных аналогов.

Общий заряд белка играет важную роль в неэкслюзионных эффектах. Основные белки (изоэлектрическая точка  $> 7$ ) обычно образуют ионные связи между аминокруппами белков и силанольными группами на поверхности силикагеля, что приводит к ионной инклюзии [18]. Кислые белки (изоэлектрическая точка  $< 7$ ) обычно показывают ионную эксклюзию при низкой ионной силе подвижной фазы. Эта ионная эксклюзия легко объясняется взаимодействием слабоанионного сорбента с отрицательно заряженными молекулами белков. Этот эффект сильно выражен при малых значениях  $\mu = 0,04-0,2$ . Так, время удерживания  $t_i$  проинсулин-S-сульфоната даже меньше  $t_i$  гибридного белка при  $\mu = 0,4-0,1$ . При увеличении ионной силы до  $\mu = 0,8$  разница времен выхода соответствующих сульфированных, линейных и свернутых белков и их разрешение существенно уменьшается из-за проявления общих гидрофобных взаимодействий. При этом кривые зависимости коэффициента распределения, соответствующие проинсулин-S-сульфонату и гибриднему белку-S-сульфонату, уже в указанном на рис. 1 диапазоне ионной силы принимают сигмовидную форму, в то время как кривые, соответствующие остальным белкам, примут ее при дальнейшем увеличении значения  $\mu$  и возрастании гидрофобных и абсорбционных взаимодействий. Сигмовидная форма кривых на рис. 1 показывает, что удержи-

вание белков сильно зависит от концентрации электролита в элюенте как при малых значениях  $\mu$  (0,02—0,1), так и при больших (0,4—1). Наиболее стабильное разделение проходит при величине  $\mu$  0,1—0,4.

На рис. 2 показано, что при увеличении ионной силы буфера за счет добавления в 0,1 М Na-фосфат 0,2 М NaCl (pH 7,0) и 0,2 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7,0) также происходит увеличение времени удерживания всех инсулинсодержащих белков, но влияние присутствия 0,2 М NaCl меньше, чем 0,2 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, за исключением проинсулин-S-сульфоната и гибридного белка-S-сульфоната. Этот факт можно объяснить тем, что сульфированные белки в присутствии ионов SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> обладают меньшим сродством к полистирол-полиольному покрытию силикагеля [27] и элюируются раньше, чем в присутствии ионов Cl<sup>-</sup>.

Для уменьшения влияния водородных связей и гидрофобных взаимодействий и ослабления сродства инсулинсодержащих белков к сорбенту в качестве добавок к Na-фосфатному буферу использовали органические модификаторы (MeOH, CH<sub>3</sub>CN) и денатурирующие агенты в различных концентрациях. При добавлении в подвижную фазу 10—20% CH<sub>3</sub>CN (рис. 3) на фоне слабого уменьшения времени элюции образцов происходят относительные изменения времен выхода свернутых и линейных проинсулинов и гибридных белков, при этом ширина пиков уменьшается, а разрешение увеличивается [34]. Как и должно быть по классическому механизму разделения, свернутые белки (2,6) элюируются позднее их линейных аналогов (3,5). На рис. 3 эти различия обозначены заштрихованными участками. Видно, что удерживание линейных проинсулина (3) и гибридного белка (5) уменьшается уже при нескольких процентах ацетонитрила в подвижной фазе, в то время как у их свернутых аналогов (2,6) остается практически неизменным. При больших концентрациях CH<sub>3</sub>CN (>30%) в условиях гидратации молекул органического модификатора происходят нарушения процессов сольubilизации белков и их конформационные изменения, иногда приводящие к денатурирующим эффектам, что вызывает неспецифическую адсорбцию молекул белка на носителе, уширение пиков и понижение селективности их разделения [13]. Несмотря на небольшие различия в полярности метанола и ацетонитрила [35], при элюировании образцов в 0,1 М Na-фосфате с 20% MeOH (рис. 4) наблюдается общее уменьшение ширины пиков и сближение значений  $K_d$ , соответствующих свернутым и линейным проинсулинам и гибридным белкам на условных прямых, но не происходят относительные изменения их времен выхода, как в случае с CH<sub>3</sub>CN. Сродство к сорбенту у этих линейных белков в системе с метанолом выше, чем с ацетонитрилом. Разрешение практически не увеличивается из-за понижения селективности разделения.

Денатурирующие условия разделения обеспечивали добавление в 0,1 М Na-фосфат SDS и гуанидингидрохлорида, которые в растворе образуют сложные комплексы с белками и существенно влияют на их удерживание. Процесс комплексообразования SDS-белок наглядно продемонстрирован рис. 5. При малых концентрациях SDS (0,01—0,05%) наблюдается резкое уменьшение  $K_d$  как функции времени удерживания. Именно в этом диапазоне концентраций происходит основное образование SDS-белковых комплексов, радиус гидратации которых влияет на  $K_d$ . Дальнейшее увеличение концентрации SDS (0,05—0,2%) слабее влияет на удерживание, хотя функция коэффициента распределения на данном интервале концентрации SDS является монотонно убывающей. Это свидетельствует о дальнейшем комплексообразовании. Из рис. 5 видно, что при концентрации SDS 0,01—0,02% также происходит вышеописанное изменение времени элюции линейных и глобулярных проинсулинов и гибридных белков, причем в случае проинсулина пересечение кривых  $K_d$  (2 и 3) происходит при большей концентрации SDS, чем в случае гибридных белков (кривые 5, 6) (см. рис. 5). Это явление в меньшей степени наблюдается при элюировании с ацетонитрилом и в 6 М гуанидингидрохлориде (рис. 6), т. е. вклад гидрофобных взаимодействий в сродство к сорбенту у линейного проинсулина выше, чем у

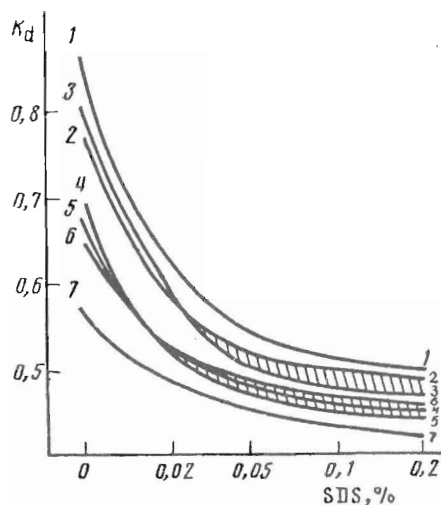


Рис. 5

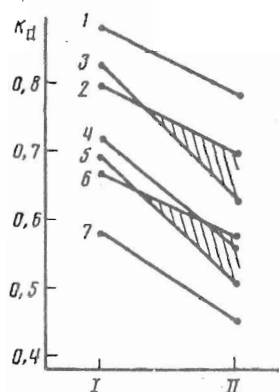


Рис. 6

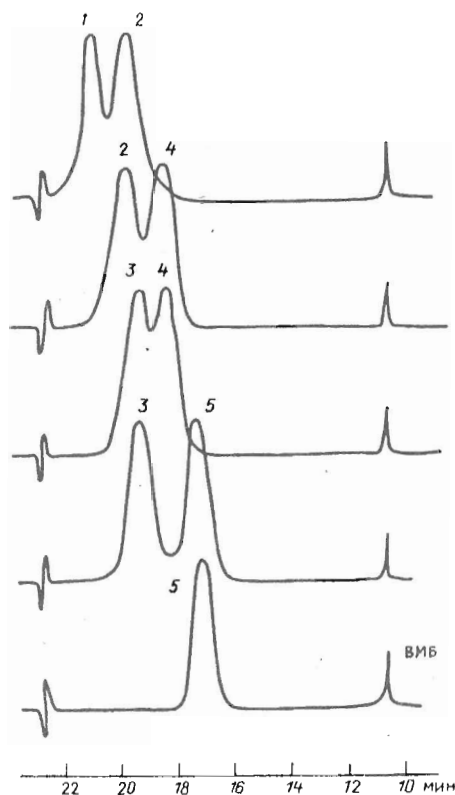


Рис. 7

Рис. 5. Зависимость  $K_d$  инсулинсодержащих белков от концентрации SDS в подвижной фазе (0,1 М Na-фосфат, pH 7,0). Условия и обозначения см. рис. 1

Рис. 6. Зависимость  $K_d$  инсулинсодержащих белков от присутствия  $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$  в подвижной фазе (0,1 М Na-фосфат, pH 7,0). Линии соединяют значения  $K_d$  соответствующих белков в буфере без  $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$  (I) и в присутствии 6 М  $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$  (II). Условия и обозначения см. рис. 1

Рис. 7. Разделение инсулинсодержащих белков, присутствующих на каждой стадии технологии получения инсулина. Подвижная фаза — 0,1 М Na-фосфат с 6 М  $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$  (pH 7,0). Остальные условия см. рис. 1. ВМБ — высокомолекулярные белки

гибридного белка. Из различий в аминокислотной последовательности этих белков [1] следует, что фрагмент А-белка не усиливает эти взаимодействия с сорбентом, а, наоборот, ослабляет. Учитывая особые гидрофильные свойства С-пептида [36], можно сделать вывод, что слабая адсорбция возникает либо за счет специфических взаимодействий с сорбентом SH-групп, либо за счет открытых гидрофобных аминокислотных остатков, содержание которых велико в В-цепи инсулина.

Эффективное с точки зрения поставленной ранее задачи [1, 34] хроматографическое разделение инсулинсодержащих белков было выполнено в 0,1 М Na-фосфате с 6 М  $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$  (pH 7,0). Видно (рис. 6), что в этих условиях расстояние между точками, соответствующими  $K_d$  белков (в том числе трудно-



разделимых линейного (3) и свернутого проинсулина (2)), больше, чем на других диаграммах. Так как ширина пиков меньше, чем в нативных условиях [33], эффективность разделения пиков выше, что подтверждается разделением близкорасположенных пар проинсулинов (2 и 4), (3 и 4), а также проинсулина (2) и инсулина (1) (рис. 7). Более полное разделение может быть получено на колонке с меньшим диаметром пор.

В результате проведенной работы выявлены закономерности эксклюзионно-сорбционных взаимодействий инсулинсодержащих белков с носителем в зависимости от их химической и пространственной структуры, выполненные на колонке TSK G 3000 SW в нативных и денатурирующих условиях. Выявлены механизмы слабой адсорбции линейных проинсулина и гибридного белка на носителе, проявляющейся в неденатурирующих условиях разделения. Полученные результаты используются для ЭВЭЖХ-анализа основных и промежуточных продуктов практически на всех стадиях технологии получения генно-инженерного инсулина человека.

### Экспериментальная часть

Для эксклюзионной ВЭЖХ использовали колонки TSK G 3000 SW (0,75×30 см) (TOSOH, Япония); элюирование проводили со скоростью 0,5 мл/мин. Хроматографию осуществляли на насосе Waters 510 с инжектором Waters U6K, спектрофотометром Waters 490E, интегратором Waters 740 (США). Для разделения были использованы образцы инсулина, проинсулина, проинсулина денатурированного, проинсулин-S-сульфоната, линейного гибридного белка (ранее описаны в работе [1]), а также ренатурированного гибридного белка, замкнутого по S-S-связям проинсулина, и гибридного белка-S-сульфоната (сульфированы SH-группы проинсулина) (получены в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН). Для идентификации — стандартный образец инсулина человека (Atlanta, cat. N 83/500, Chemie- und Handelsgesellschaft mbH, D-6900 Heidelberg 1, Германия). Подлинность полученного в ИБХ РАН по данной схеме инсулина была подтверждена ВЭЖХ со стандартным образцом, электрофорезом в полиакриламидном геле (инсулин выявляется на фореграммах одной полосой, соответствующей  $5,8 \pm 0,5$  кДа), анализом N-концевой аминокислотной последовательности и полного аминокислотного состава, а также масс-спектрометрически (найдена молекулярная масса инсулина — 5808,2). Физиологическая активность белка оказалась не ниже современных требований — выше 27 ед./мг [4, 6]. Использованы следующие реактивы (ос.ч): ацетонитрил, метанол, вода, очищенная на установке Milli-Q (Waters, США), NaOH, NaCl, NH<sub>4</sub>OAc, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, CF<sub>3</sub>COOH (Fluka, Германия), SDS (Serva, Германия), CH<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub> (Merck, Германия). Перед хроматографией элюенты фильтровали через нитроцеллюлозные и GVWP-фильтры (диаметр пор 0,45 мкм; Waters, США) и дегазировали в течение 20 мин.

Авторы благодарят сотрудника ИБХ РАН К. В. Мальцева за любезно предоставленные им образцы инсулинсодержащих белков.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клоушниченко В. Е., Якимов С. А., Мальцев К. В., Арутюнян А. М., Иванов А. Е., Вульфсон А. Н. // Биорган. химия. 1992. Т. 18. № 12. С. 1478—1486.
2. Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D. // Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography. N. Y.: A Wiley Intersci. Publ., 1979. P. 1—30.
3. Yang Y. B., Verzele M. // J. Chromatogr. 1987. V. 391. № 1. P. 383—393.
4. Yau W. W., Gimard C. R., Kirkland J. J. // J. Chromatogr. 1978. V. 149. № 2. P. 465—487.
5. Said H. M., Newsom A. E., Tippins B. L., Mathews R. A. // J. Chromatogr. 1985. V. 324. № 1. P. 65—73.
6. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T. // J. Chromatogr. 1980. V. 193. № 1. P. 29—36.
7. Montelaro R. C., West M., Issel C. J. // Anal. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 398—406.

8. Imamura T., Konishi K., Yokoyama M., Konishi K.//*J. Liquid Chromatogr.* 1981. V. 4. № 4. P. 613—627.
9. Kirkland J. J., Yau W. W., Stoklosa H. J., Dilks C. H.//*J. Chromatogr. Sci.* 1977. V. 15. № 7. P. 303—316.
10. Regnier F. E.//*Science.* 1982. V. 222. № 4621. P. 245—252.
11. Schrader E., Preiffer E. F.//*J. Liquid Chromatogr.* 1985. V. 8. № 6. P. 1121—1137.
12. Mizutani T., Mizutani A.//*J. Pharm. Sci.* 1978. V. 67. № 1. P. 1102—1105.
13. Rivier J. E.//*J. Chromatogr. Sci.* 1980. V. 18. № 1. P. 211—222.
14. Barth H. G.//*J. Chromatogr. Sci.* 1980. V. 18. № 19. P. 409—429.
15. Takagi T., Takeda K., Okuno T.//*J. Chromatogr.* 1981. V. 208. № 1. P. 201—208.
16. Josic Dj., Baumann H., Reutter W.//*Anal. Biochem.* 1985. V. 142. № 1. P. 473—479.
17. Prannkoch E., Lu K. C., Regnier F. E., Barth G. H.//*J. Chromatogr. Sci.* 1980. V. 18. № 9. P. 430—441.
18. Schmidt D. E., Giese R. W., Connor D., Karger B. L.//*Anal. Chem.* 1980. V. 52. № 1. P. 177—182.
19. Murray G. J., Youle R. J., Gandy S. E., Zirzow G. C., Barranger J. A.//*Anal. Biochem.* 1985. V. 147. № 2. P. 301—310.
20. Swergold G. D., Rubin C. S.//*Anal. Biochem.* 1983. V. 131. № 2. P. 295—300.
21. Mizutani T., Mizutani A.//*J. Chromatogr.* 1975. V. 111. № 1. P. 214—216.
22. Rubenstein M.//*Anal. Biochem.* 1979. V. 98. № 1. P. 1—8.
23. British Pharmacopeia. London, Her Majesty's Stationery Office, 1988. P. 312—313.
24. The United States Pharmacopeia. New York, United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1984. P. 2177—2179.
25. Majors R. E.//*LC-GC Int.* 1992. V. 5. № 4. P. 12—22.
26. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T.//*J. Chromatogr.* 1980. V. 190. № 1. P. 297—303.
27. Fukano K., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T.//*J. Chromatogr.* 1978. V. 166. № 1. P. 47—54.
28. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Sawada Y., Hashimoto T.//*J. Chromatogr.* 1980. V. 190. № 2. P. 305—310.
29. Wehr C. T., Abbott S. R.//*J. Chromatogr.* 1979. V. 185. № 2. P. 453—462.
30. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T.//*J. Chromatogr.* 1980. V. 193. № 2. P. 311—315.
31. Rokushika S., Ohkawa T., Hatano H.//*J. Chromatogr.* 1979. V. 176. № 2. P. 456—461.
32. Richter W. O., Jacob B., Schwandt P.//*Anal. Biochem.* 1983. V. 133. № 1. P. 288—291.
33. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T.//*J. Chromatogr.* 1980. V. 193. № 3. P. 458—463.
34. Ключниченко В. Е., Вульфсон А. Н., Мальцев К. В., Беляев С. В.//*Журн. физ. химии.* 1991. Т. 65. № 10. С. 2840—2842.
35. Схунмакерс П.//*Оптимизация селективности в хроматографии.* Пер. с англ. М.: Мир, 1989. С. 39—46.
36. Овчинников Ю. А. *Биоорганическая химия.* М.: Просвещение, 1987. С. 247.

Поступила в редакцию  
17.VII.1992

После доработки  
29.IX.1992

V. E. Klyushnichenko, A. N. Wulfson

## RECOMBINANT HUMAN INSULIN II. SIZE-EXCLUSION HPLC OF BIOTECHNOLOGICAL PRECURSORS. FACTORS, AFFECTING RETENTION AND SELECTIVITY

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Mechanisms of the exclusion-sorption interaction of insulin-containing proteins with the column support in accordance with the chemical and three-dimensional structure were considered. The weak adsorption of the linear proinsulin and fusion protein in non-denaturing conditions, and dynamics of the SDS-protein complex's formation in denaturing conditions were studied. The obtained results are used for SE HPLC analysis of the main products and intermediates at essentially all steps of the recombinant human insulin production.