



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 167207

(51) Int. Cl.³ C 07 K 7/40, 1/02

(21) Patentsøknad nr. 843048
(22) Inngivelsesdag 27.07.84
(24) Løpedag 27.07.84
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT,
Postfach 800320,
DW-6230 Frankfurt am Main 80,
DE

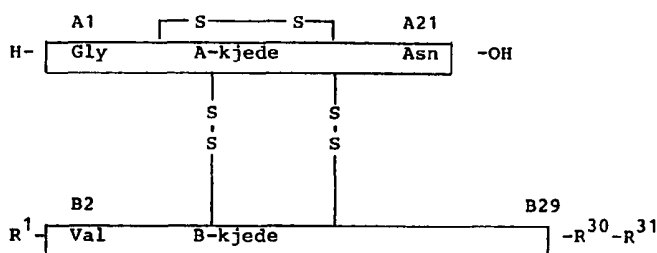
(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Aiment tilgjengelig fra 30.01.85
(44) Utlegningsdag 08.07.91
(72) Oppfinner ULRICH GRAU, Hofheim am Taunus,
DE

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, Oslo.

(30) Prioritet begjært 29.07.83, DE, nr. 3327709.

(54) Oppfinnelsens benevnelse Fremgangsmåte til fremstilling av insulinderivat-
krystallsuspensjoner.

(57) Sammendrag Fremgangsmåte til fremstilling av krystallsus-
pensjoner av ett eller flere insulinderivater med for-
mel I,



hvor R^1 betyr H eller H-Phe,

R^{30} betyr resten av en nøytral, genetisk koderbar L-aminosyre og

R^{31} betyr en fysiologisk forenlig, organisk gruppe av basiskarakter med inntil 50 C-atomer, hvis oppbygning er delaktig 0 til 3 α -aminosyrer og hvis eventuelt tilstedeværende endeplasserte karboksylfunksjon kan foreligge fri, som esterfunksjon, som amidfunksjon, som lakton eller redusert til CH_2OH , og et isoelektrisk punkt mellom 5, 8 og 8,5,

hvor krystallisasjonen gjennomføres i et vandig medium i nærheten av det isoelektriske punkt av derivatet eller derivatene i nærvær av en aromatisk hydroksyforbindelse. Det omtales også ifølge fremgangsmåten oppnådde krystaller og krystallsuspensjoner samt deres anvendelse.

(56) Anførte publikasjoner Britisk (GB) patent nr. 729670.

Krystallisering av insulin såvel med hensyn til de struk-
turanalytiske arbeider (Adams et al., Nature 224, 491 (1969),
The Peking Insulin Structure Research Group, Sc. Sinica XVII,
152-118 (1974) som også med hensyn på farmasøytiske anvendel-
ser (Schlichtkrull, Insulin-Kristalle (1961)), er et intenst
bearbeidet område. For terapeutisk anvendelse av insulin
som forsinkelsesform står i forgrunnen en mest mulig definert
krystallstørrelse som vanligvis ikke bør overskride ca. 30 μm
slik at overflaten på direkte og reproducerbar måte er
sammenhengende med insulinets absoluttmengde. Med slike
såkalte monodispersive suspensjoner kan man forvente en
definert gjenoppløsningskinetikk.

Eksempler på terapeutisk anvendte insulinkrystallsuspensjoner
med slike egenskaper er suspensjoner av ca. 25 μm store
romboedriske sink-insulinkrystaller, som i nærvær av 0.8 til
2.5% sink (referert til insulinmassen) er stabile ved nøytral
pH verdi og viser en forsinket virkning samt isofan-insulin-
protamin-krystaller som finner anvendelse i form av ca. 10 μm
lange og ca. 1 μm tykke småstaver i forsinkningspreparater.

Dessuten er det kjent noen ytterligere krystallmodifikasjoner
av insulin som hittil bare var av interesse for røntgenstruk-
turanalyse. Således ble det under sure pH-betingelser dannet
sinkfrie ortorombiske og monokline krystaller (Einstein, Low,
Acta Cryst. 15, 32-34 (1962). Ved det isoelektriske punkt
ble det likeledes i fravær av sink dannet mindre rombodeka-
eder, som er å tilordne den kubiske romgruppe (Schlichtkrull,
Insulin-Kristalle (1961)). Endelig ble det likeledes av
Schlichtkrull dessuten omtalt en monoklin krystallform av
insulin som ble dannet over det isoelektriske punkt i nærvær
av sink og i nærvær av fenol eller fenolderivater. Disse
krystaller vokser i løpet av noen dager betraktelig i
størrelse (inntil 3 mm) og har skarpe kanter. På en
interessant måte ble disse krystaller bare funnet på
glassflater, ikke på oppløsningens frie overflate (Schlicht-
krull, Insulin-Kristalle, side 57-60, (1961)).

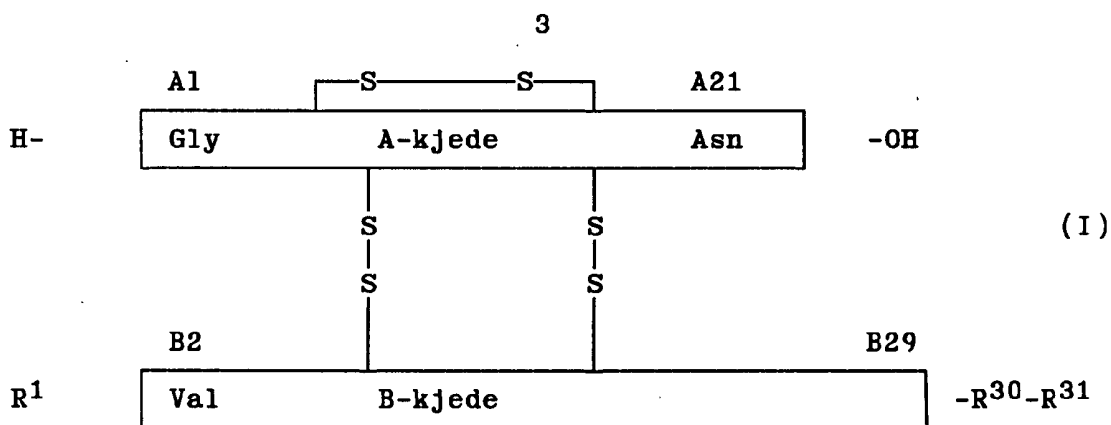
En sammenligning til insulin eller proinsulins forskjellige krystalliseringsforhold finner man ved insulinderivater som i deres nettoladning minst har en positiv ladning mer, således at deres isoelektriske punkt er forskjøvet til høyere pH-verdi. Dertil hører spesielt slike derivater som ved B-kjedens C-terminus har en ekstra gruppe av base-karakter, for eksempel de som bekjent i pankreasekstrakter i mindre mengder funnede proinsulin-avbygningsprodukter Insulin-Arg^{B31}-OH og Insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH. Andre derivater med tilsvarende egenskaper er tilgjengelig semisyntetisk. Slike insulinderivater, fremgangsmåter til deres fremstilling og midler inneholdende disse samt deres anvendelse er gjenstand for de tyske patentsøknader P 33 26 672.4 og P 33 26 473.2.

De har eksempelvis andre basiske aminosyrer eller basiske aminosyrederivater (f. eks. D-aminosyrer, ornitin, hydrok-sylysin, argininol) istedenfor eller i tillegg til arginin eller en ester- eller amidgruppering med enkle alkoholer eller aminer ved C-terminusen. Derved kan alkoholen eller amidet medbringe en ekstra positiv ladning som for eksempel i insulin-(B30)-cholinester.

Det ble nå overraskende funnet at disse derivater lar seg krystallisere i nærheten av deres isoelektriske punkt fra et vandig medium i nærvær av en aromatisk hydroksyforbindelse i form av meget jevntformede prizmer av ca. 10 µm størrelse.

Oppfinnelsen vedrører følgelig en fremgangsmåte til fremstilling av krystallsuspensjoner av ett eller flere insulinderivater med formel I,

167207



hvor

R^1 betyr H-Phe,

R^{30} betyr Ala eller Thr,

R^{31} betyr $\text{Arg}^{B31}\text{-OH}$, $\text{Arg}^{B31}\text{-Arg}^{B32}\text{-OH}$, $\text{Arg}^{B31}\text{-Lys}^{B32}\text{-O-CH}_3$ eller cholinester,

og et isoelektrisk punkt mellom 5,8 og 8,5,

som eventuelt i tillegg inneholder a) ett eller flere insulinderivater med formel (I) i oppløst eller amorf form,

eller b) insulin eller c) proinsulin eller d) C-peptid eller

e) en kombinasjon herav, idet komponentene b) til d) respektive foreligger i oppløst, amorf og/eller krystallinsk form, i nærvær av en fenol eller kresol eller begge, idet fremgangsmåten er kjennetegnet ved at krystalliseringen gjennomføres i et vandig medium i nærheten av det isoelektriske punkt til derivatet eller derivatene.

I en foretrukket utførelsesform er fremgangsmåten kjennetegnet ved at resten R^{31} i formel (I) inneholder aminosyre-rester, respektive rester av deres derivater utelukkende i L-form.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform benytter man i krystallisasjonsmediet en sinkmengde på inntil 1% referert til insulinmassen eller et annet hjelpemiddel med forsinkende virkning, eller en egnet mengde bufferstoff eller et vanlig isotonmiddel eller kombinasjon herav.

167207

4

I en ytterligere foretrukket utførelsesform utføres krystallisasjon ved temperaturer fra 3°C til 27°C, og man benytter en konsentrasjon av insulinderivatet (I) i krystallisasjonsmediet på 0,2 - 40 mg/ml.

5

Eksempelvis lar det seg ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen å få krystallsuspensjoner av følgende insulin-derivater:

10

- Humaninsulin-Arg^{B31}-OH
- Svineinsulin-Arg^{B31}-OH
- Storfeinsulin-Arg^{B31}-OH
- Storfeinsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
- Humaninsulin-Lys^{B31}-OH

15

- Humaninsulin-D-Arg^{B31}-OH
- Humaninsulin-D-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
- Humaninsulin-Arg^{B31}-D-Arg^{B32}-OH
- Humaninsulin-Arg^{B31}-Lys^{B32}-OH

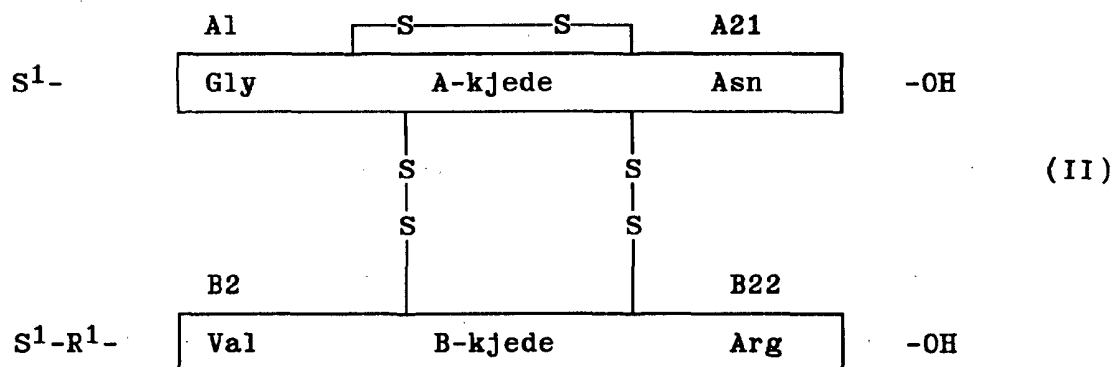
20

- Humaninsulin-(B30)-O-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃

Insulinderivatene med formel I fremstilles, idet

a) et des-oktapeptid (B23-30)-insulin med formel II,

25

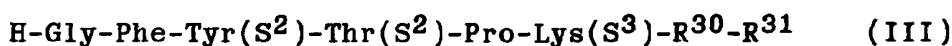


30

35

hvor i R¹ benytter Phe eller en binding og S¹ betyr en proton-solvolytisk eller ved β-eliminering avspaltbar aminobeskyt-

telsesgruppe som tert.-butyloksykarbonyl-(Boc), tert.-amyloksykarbonyl-(Aoc) eller metylsulfonyletyloksykarbonyl-(Msc)-resten, kondenseres med et peptid med formel III



hvor R^{30} eller R^{31} har ovennevnte betydninger, S^2 betyr hydrogen, Bzl eller Bu^t og S^3 betyr en uretanbeskyttelsesgruppe som Boc, Moc, Fmoc eller Z, idet i restene R^{30} og R^{31} foreligger eventuelt tilstedeværende fri COOH- , OH- , SH- , $\omega\text{-NH}_2\text{-}$, guanidino og/eller imidazolgrupper, hvis nødvendig, beskyttet på 1 og for seg kjent måte, og deretter avspaltes eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper på 1 og for seg kjent måte,

b) et des-B30-insulin med formel I, hvor R^1 betyr H eller H-Phe og C-terminusen $\text{R}^{30}\text{-R}^{31}$ betyr sammen OH, omsetter i nærvær av trypsin eller en trypsinlignende endopeptidase en forbindelse med formel IV



hvor R^{30} og R^{31} har de ovennevnte betydninger hvor tilstedeværende fri COOH- , OH- , SH- , $\omega\text{-NH}_2\text{-}$, guanidino- og/eller imidazol-funksjoner, hvis nødvendig, foreligger på 1 og for seg kjent måte beskyttet og deretter avspaltes eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper på 1 og for seg kjent måte, eller

c) for fremstilling av et insulinderivat med L-konfigurerte aminosyrerester i R^{31} spaltes et proinsulin, proinsulinderivat, preproinsulin eller preproinsulinderivar eller et intermediat av disse forbindelser kjemisk og/eller enzymatisk.

Des-Phe B^1 -insuliner av utgangsforbindelser er eksempelvis kjent fra DE-PS 20 05 658 eller fra EP-A-46 979.

Det ved fremgangsmåtevariant b) som utgangsforbindelse
anvendte Des-B30-insuliner er eksempelvis kjent fra EP-A-46
979 eller Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359/1978/799. Det
5 ved variant b) anvendte utgangsmateriale med formel IV
fremstilles på i og for seg kjent måte etter metoder fra
peptidkjemien. Brukbare beskyttelsesgrupper fra IV er omtalt
detaljert hos M. Bodanzky et al., Peptide Synthesis, Ind. Ed.
1976, Wiley & Sons.

10 Ved genteknologiske metoder er i mellomtiden human- eller
primat-proinsulin tilgjengelig som utgangsmateriale for
fremgangsmåtevariant c). Derivatene Arg(B31) og D1-Arg(B31-
32) er herav tilgjengelig ved enkel fordøyning med trypsin
15 eller trypsin-lignende enzymer. Dessuten lar det seg
imidlertid også konstruere relativt enkle plasmider som ved
spaltning av tilsvarende preproinsulinderivater fører til nye
insulinderivater, fordi det ved steder for naturlig til B31
eller B32 befinnende argininer koder for andre nøytrale,
20 basiske aminosyrer.

Fremstillingen av proinsulin under anvendelse av rekombina-
sjon-DNA-metodologien krever dannelsen av en DNA-sekvens for
aminosyresekvensen av et proinsulin, hvilket lar seg oppnå
25 ved isolering, konstruksjon eller en kombinasjon av begge.
Proinsulin-DNA anvendes da i lesefase i en egnet klonings- og
ekspressjonsbærer. Bæreren tjener til transformering av en
egnet mikroorganisme, og den herved dannede transformerte
mikroorganisme underkastes deretter fermenteringsbetingelser
30 som fører til dannelsen av ytterligere kopier av proinsulin-
genholdig vektor og til ekspresjon av proinsulin av et
reninsulinderivat eller en proinsulinforløper resp. et
preproinsulinderivat.

35 Dreier det seg ved ekspresjonsproduktet om en pro-insulin-
forløper, da inneholder et slik produkt vanligvis pro-
insulinaminosyresekvensen som ved deres endeplasserte

aminogruppe er bundet til et bruddstykke av et protein som normalt uttrykker ved gensekvensen hvor proinsulinet eller proinsulinderivatet er anvendt. Proinsulinaminyresekvensen er ved proteinbruddstykket bundet over et spesifikt spaltbart
5 sted, hvor det eksempelvis dreier seg om metionin. Det dannede proinsulinaminyresekvens avspalter det sammensmeltede genprodukt, eksempelvis omtalt i DE-A-32 32 036, og proinsulinet isoleres etter rensing.

10 Krystallisasjonsmediet ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan inneholde sink, idet sinkmengden fortrinnsvis utgjør inntil 1%, spesielt imidlertid ikke over 0,8%, referert til insulin-derivat-massen. Vanligvis er det tilstrekkelig til
15 krystallisering bare relativt små sinkmengder på maksimalt 40 $\mu\text{g}/100$ enheter, fortrinnsvis imidlertid ikke over 30 $\mu\text{g}/100$ enheter, som blant annet allerede kan være inneholdt i tørrstoffet.

Krystallisasjonen foregår fortrinnsvis innen et pH-område på
20 1 pH-enhet under det isoelektriske punkt inntil 1 pH-enhet over dette punkt ($\text{pI} \pm 1$). pH-innstillingen kan eventuelt foretas ved hjelp av en buffer (f. eks. fosfat, acetat eller citrat).

25 I krystallisasjonsmediet befinner det seg dessuten fenol, cresol eller et lignende aromat. Krystallisasjonstemperaturen utgjør fortrinnsvis 3 til 27°C , spesielt 10 til 20°C . Suspensjonen kan bevegges svakt under fremgangsmåten (f. eks. omrøres i et rørekar). Konsentrasjonen av insulinderivatet
30 med formel I utgjør før krystallisasjonen fortrinnsvis 0,2 til 40 mg/ml , spesielt 1 til 7,5 mg/ml .

Krystallene kan eksempelvis også fås i et medium som allerede tilsvarende den ferdige injeksjonssuspensjon (ved rene forsinkelsespreparater). Det (sterile) medium som følgelig allerede
35 ved siden av fenol eller lignende aromater og eventuelt sink

inneholder et isotonimiddel som for eksempel NaCl, Glyserol samt et bufferstoff som for eksempel natriumfosfat.

5 Krystallsuspensjonen som oppnås ifølge oppfinnelsen kan i tillegg inneholde a) ett eller flere insulinderivater med formel I i oppløst og/eller amorf form, b) insulin og/eller c) proinsulin og/eller d) C-peptid i oppløst, amorf og/eller krystallinsk form. De kan da dessuten inneholde hjelpemidler med forsinkende virkning på insulinfrigjøringen som globin
10 eller protaminsulfat.

Ved siden av fordelene med hensyn til krystallstørrelse og deres homogenitet betinger det relativt lave sinkinnhold som ligger under konsentrasjonen, hvor sink er å betrakte som
15 depotbærer, at krystallasjonssuspensjonen ifølge oppfinnelsen er fritt blandbart med oppløst insulin. Det er således eksempelvis mulig å forene insulinoppløsninger med suspensjoner av insulinderivatkrystallene før applikasjon. Ved variasjon av mengden av de enkelte komponenter lar virknings-
20 profilen av det således oppnådde legemiddel seg styre optimalt.

Skulle det være nødvendig med en høyere sinkkonsentrasjon til stabilitet av krystallene (om dette for eksempel er tilfelle
25 ved sink-insulin-romber), så ville tilsatt oppløst insulin falle ut og ikke mere være virksom som hurtigvirkende komponenter.

Således har krystallsuspensjoner av de omtalte derivater på
30 ideell måte de egenskaper som er ønskelig til behandlingen av Diabetes mellitus. Forsinkelsesprinsippet er inherent for insulinderivatene og går tilbake på et protein-kjemisk fenomen, tungtoppløseligheten ved det isoelektriske punkt.

35 Oppfinnelsen skal forklares nærmere ved hjelp av noen eksempler.

Eksempel 1

Svineinsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH fremstilt ved tryptisk fordøyelse av svine-proinsulin som krystallsuspensjon av ca. 10 µm store prizmer med 40 I.E./ml, og deres størrelsesfordeling.

I vann blandes:

Insulin-Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -OH fra svin (27,0 I.E./mg)	14,8 mg
Natriumdihydrogenfosfat-dihydrat	30,0 mg
m-kresol	15,0 mg
Fenol	6,0 mg

Med fortynnet NaOH innstilles pH = 7,4 og bringes med vann til et samlet volum på 10 ml. Blandingen beveges svakt ved 18°C, og det oppstår prismeformede krystaller med skarpe kanter som har vokst meget jevnt, er ca. 10 µm store og under det polariserte lys i et meget lite vinkelområde viser ekstinksjonseffekter. Disse krystallers størrelsesfordeling ble målt i Coulter Counter. Kurven (se figuren) viser en meget homogen størrelsesfordeling; den overveiende mengde har en ekvivalentdiameter (referert i kuleformede partikler) på 5 µm - 10 µm.

Eksempel 2

Krystallisering av en blanding av 50% humaninsulin-Arg^{B31}-OH, fremstilt ved tryptisk spalting av en genteknologisk utvunnet preproinsulin og 50% humaninsulin-B30-cholinester, fremstilt ved semisyntese fra svineinsulin i en tilberedning på 40 I.E./ml og deres forsinkede virkning.

I vann blandes:

Humaninsulin-Arg ^{B31} -OH (27,5 I.E./mg)	7,3 mg
Humaninsulin-(B30)-cholinester (28,0 I.E./mg)	7,1 mg
Natriumdihydrogenfosfat-di-hydrat	21,0 mg
m-kresol	15,0 mg
Fenol	0,6 mg
Glyserol	16,0 mg

167207

10

Med fortynnet NaOH innstilles pH = 7,0 og oppfylles med vann til et samlet volum på 10 ml. Blandingen bevegges svakt ved værelsestemperatur idet det oppstår prismeformede krystaller på ca. 10 μ m størrelse. En slik suspensjon viser på kaniner ved indusering på 4,0 I.E./kg en sterk forsinket virkning. Blodglukoseverdiene (i % av utgangsverdien) er (n = 12 dyr):

t(h)	0	1	2	4	6
Blodglukose	100%	51%	44%	69%	83%

Eksempel 3

Suspensjon av krystallinsk humaninsulin-Arg^{B31}-Lys^{B32}-OCH₃ fremstilt ved semisyntese av svineinsulin i blanding med 50% isiofan-protamin-humaninsulinkrystaller med 100 E/ml.

Man oppløser et samlet volum på 10 ml i vann:

Humaninsulin-Arg^{B31}-Lys^{B31}-OCH₃,

(27,0 I.E./mg), sinkfri 37,0 mg

Sinkklorid 0,6 mg

Natriumdihydrogenfosfat-dihydrat 21,0 mg

m-kresol 15,0 mg

Fenol 6,0 mg

Glyserol 160,0 mg

Med 1N HCl resp. 1 NaOH innstilles pH = 7,4. Blandingen omrøres svakt ved værelsestemperatur idet det i løpet av en dag oppstår prismeformede krystaller. Adskilt fremstilles isofan-humaninsulinkrystaller (NPH), idet man i vann blander:

Humaninsulin (28,0 I.E./mg) 35,7 mg

Protaminsulfat 3,2 mg

Natriumdihydrogenfosfat-dihydrat 21,0 mg

m-kresol 15,0 mg

Fenol 6,0 mg

Glyserol 160,0 mg

Med 1N HCl resp. 1 NaOH innstilles pH = 7,4 og kompletteres med vann 10 ml. Blandingen omrøres svakt idet det oppstår de typiske stavformede NPH-krystaller.

5

De to suspensjoner has sammen, idet det oppstår det ønskede blandingspreparat med 100 I.E./ml, som viser en sterkt forsinket virkning i dyreforsøk.

10 Eksempel 4

Depot-preparatet med 40 I.E./ml av 75% krystallinsk humaninsulinArg^{B31}-Arg^{B32}-OH, utvunnet ved tryptisk spalting av genteknologisk utvunnet preproinsulin, og 25% humaninsulin i oppløst form.

15

Man oppløser i 250 ml fortynnet HCl:

1,111 g humaninsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH (27.0 I.E./mg) således at pH utgjør 4,0. Denne oppløsning sterilfiltreres på egnet måte.

20

Adskilt oppløser man i vann:

Natriumdihydrogenfosfat-dihydrat	1,575 g
m-kresol	1,125 g
Fenol	0,450 g
Glyserol	14,118 g

25

Med 1N NaOH innstilles pH = 7,5 og kompletteres med vann til 0,5 liter. Denne bufferoppløsning sterilfiltreres likeledes på egnet måte.

30

Under aseptiske betingelser has under omrøring de to sterile oppløsninger sammen og omrøres så lenge inntil det er dannet homogene krystaller av ca. 10 µm størrelse (A). En insulin-oppløsning (B) fremstilles idet man sammenblander:

35

Humaninsulin (28,0 I.E./mg)	0,357 g
Natriumdihydrogenfosfat-dihydrat	0,525 g

167207

12

m-kresol	0,375 g
Fenol	0,150 g
Glyserol	4,706 g

5 Oppløsningen bringes med fortynnet NaOH til pH = 7,3 og
kompletteres med vann til 0,25 liter. Denne oppløsning
sterilfiltreres. Under aseptiske betingelser settes insulin-
oppløsningen (B) til krystallsuspensjonen (A), og preparatet
avfylles i egnede flasker til flere gangers uttak.

10 Et slikt depotpreparat kan anvendes for behandling av
Diabetes mellitus.

15

20

25

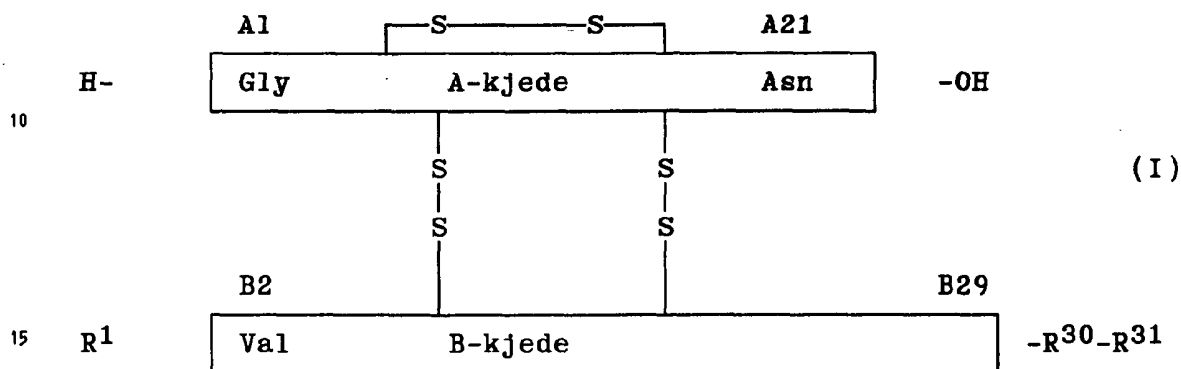
30

35

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte til fremstilling av krystallsuspensjoner av ett eller flere insulinderivater med formel (I),



hvor

R¹ betyr H-Phe,

20 R³⁰ betyr Ala eller Thr, og

R³¹ betyr Arg^{B31}-OH, Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH, Arg^{B31}-Lys^{B32}-O-CH₃ eller cholinester, og et isoelektrisk punkt mellom 5,8 og 8,5, som eventuelt i tillegg inneholder

25 a) et eller flere insulinderivater med formel (I) i oppløst og/eller amorf form, eller b) insulin, eller c) proinsulin, eller d) C-peptid eller e) en kombinasjon herav, idet komponentene b) til d) respektive, foreligger i oppløst, amorf og/eller krystallinsk form, i nærvær av en fenol eller kresol eller begge, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

30 krystalliseringen gjennomføres i et vandig medium i nærheten av det isoelektriske punkt til derivatet eller derivatene.

2.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t man fremstiller resten R³¹ i formel (I) slik at den inneholder aminosyrerester, respektive rester av deres derivater utelukkende i L-form.

3.

5 Fremgangsmåte ifølge ett eller flere av kravene 1-2, karakterisert ved at man i krystallisasjonsmediet benytter en sinkmengde på inntil 1% referert til insulinmassen eller et annet hjelpemiddel med forsinkende virkning eller en egnet mengde av bufferstoff eller et vanlig isotonmiddel eller en kombinasjon herav.

10 4.

Fremgangsmåte ifølge ett eller flere av kravene 1-3, karakterisert ved at man utfører krystallisasjonen ved temperaturer på 3-27°C.

15 5.

Fremgangsmåte ifølge ett eller flere av kravene 1-4, karakterisert ved at man benytter en konsentrasjon av insulinderivatet (I) i krystallisasjonsmediet på 0,2-40 mg/ml.

20

25

30

35

167207

