



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM



(11) CH 676008 A5

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: C 12 P 21/02  
C 07 K 13/00  
A 61 K 37/02  
C 12 N 15/25

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) **PATENTSCHRIFT** A5

(21) Gesuchsnummer: 98/87

(73) Inhaber:  
F. Hoffmann-La Roche AG, Basel

(22) Anmeldungsdatum: 13.01.1987

(30) Priorität(en): 18.02.1986 US 830406

(24) Patent erteilt: 30.11.1990

(45) Patentschrift  
veröffentlicht: 30.11.1990

(72) Erfinder:  
Stern, Alvin Seth, Passaic Park/NJ (US)

(54) **Reinigung von rekombinantem Human-Interleukin-1.**

(57) Human-Interleukin-1 $\alpha$  im wesentlichen endotoxin-frei und als ein im wesentlichen homogenes Protein mit einer spezifischen Aktivität von mindestens  $5 \times 10^7$  Einheiten/mg Protein ist beschrieben. Ferner ist ein Verfahren zur Herstellung von Human-Interleukin-1 beschrieben, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Mikrobenzellen, die mit einem Expressionsvektor transformiert sind, der ein Gen für rekombinantes Human-Interleukin-1 enthält, und die zur Expression des genannten Genes induziert sind, aufgebrochen werden, unlösliches Zellmaterial von einer Zytosolfraktion abgetrennt wird und das Human-Interleukin-1 aus der Zytosolfraktion gereinigt wird. Das so gereinigte Human-Interleukin-1 bzw. Human Interleukin-1 $\alpha$  kann als pharmazeutisches Mittel verwendet werden. Außerdem sind pharmazeutische Zusammensetzungen beschrieben, die ein oben genanntes Human Interleukin-1 bzw. ein Human Interleukin-1 $\alpha$  enthalten.

### Beschreibung

Zwei Gene, welche für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Form von Human-Interleukin-1 codieren, sind in der Literatur beschrieben, so z.B. von March et al., Nature 315, 641-647 (1985). Die europäische Patent-Anmeldung, Publikations-Nr. 200 986, publiziert am 12. November 1986, mit den Erfindern Gubler et al., beschreibt die Klonierung und Expression von rekombinantem Human-Interleukin-1, d.h. einem Human-Interleukin-1 das mikrobiell hergestellt wurde. Beim darin beschriebenen Reinigungsverfahren ist ein Problem aufgrund der Unlöslichkeit dieses Proteins innerhalb der bakteriellen Wirtszellen erkennbar. Es wird angenommen, dass dieses Problem zurückzuführen ist auf die Produktion grosser Mengen von Protein in einer Umgebung, die anscheinend für die richtige Faltung des Proteins nicht geeignet ist. Die Probleme bei der Faltung des Proteins manifestieren sich in der Bildung von Einschlüssen innerhalb der Bakterien. Diese Einschlusskörper (inclusion bodies) konnten nur in stark denaturierenden Agenzien wie Harnstoff und Guanidin-Hydrochlorid aufgelöst werden.

Die Reinigungsverfahren, bei denen diese stark denaturierenden Agenzien verwendet werden liefern gereinigtes rekombinantes Human-Interleukin-1. Aus Gründen, die nicht klar erkennbar sind, jedoch möglicherweise mit der Faltung des Proteins in dieser nicht-biologischen Umgebung zusammenhängen, überschritt das beobachtete spezifische Aktivitätsniveau gereinigter Moleküle  $6 \times 10^6$  Einheiten/mg nicht. Daher war das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Reinigungsverfahren für rekombinantes Human-Interleukin-1, insbesondere für rekombinantes Human-Interleukin-1 $\alpha$ , zu entwickeln, welches die Reinigung und Solubilisierung des gewünschten Proteins in einem biologisch kompatiblen Puffersystem erlaubt und ein Produkt mit erhöhter spezifischer Aktivität ergibt.

Durch die vorliegende Erfindung wird Human-Interleukin-1 $\alpha$  im wesentlichen endotoxin-frei und als ein im wesentlichen homogenes Protein mit einer spezifischen Aktivität von mindestens  $5 \times 10^7$  Einheiten/mg bereitgestellt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von rekombinantem Human-Interleukin-1, insbesondere Human-Interleukin-1 $\alpha$ , speziell von Human-Interleukin-1 $\alpha$  mit einer Aminosäuresequenz gemäss Figur 1, im wesentlichen endotoxin frei und als ein im wesentlichen homogenes Protein mit einer spezifischen Aktivität von mindestens  $5 \times 10^7$  Einheiten/mg Protein, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass Mikrobenzellen, die mit einem Expressionsvektor transformiert sind, der ein Gen für rekombinantes Human-Interleukin-1 enthält und die zur Expression des genannten Gens induziert sind, aufgebrochen werden, unlösliches Zellmaterial von einer Zytosolfraktion abgetrennt wird und das Human-Interleukin-1 aus der Zytosolfraktion gereinigt wird. Die Mikrobenzellen werden bevorzugt mittels Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Das Human-Interleukin-1 wird bevorzugt durch eine zwei- oder drei-stufige Säulen-Chromatographie gereinigt. Besonders bevorzugt wird die

5 Zytosolfraktion unter Verwendung einer gepufferten Salzlösung z.B. Tris/HCl gepufferte NaCl-Lösung einer Gelfiltration unterworfen, die biologisch aktiven Fraktionen der Gelfiltration vereinigt und diese einer Ionenaustrausch-Chromatographie unter Verwendung eines Gradienten steigender Salzkonzentration in einer gepufferten Lösung unterworfen. Außerdem betrifft die Erfindung Human-Interleukin-1, das durch das erwähnte Verfahren hergestellt wird, insbesondere Human-Interleukin-1 $\alpha$ . Das erfindungsgemäße Human-Interleukin-1 bzw. das Human-Interleukin-1 $\alpha$  kann als pharmazeutisches Mittel verwendet werden für die Behandlung und Prophylaxe von Krankheiten. Ferner betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein erfindungsgemässes Human-Interleukin-1 bzw. ein Human-Interleukin-1 $\alpha$  enthalten. Aus Gründen, die dem Fachmann klar ersichtlich sind, kann das Human-Interleukin-1 bzw. das Human-Interleukin-1 $\alpha$  der vorliegenden Erfindung einen zusätzlichen Methioninrest am N-Terminus aufweisen.

10 Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung beruht auf der unerwarteten Entdeckung, dass ein beträchtlicher Teil des in einem bakteriellen Wirt, z.B. in E. coli, exprimierten rekombinanten Human-Interleukins-1, in der löslichen Zytosolfraktion enthalten ist, obwohl die spezifische Aktivität in dieser Fraktion weit unter derjenigen von mit Harnstoff extrahierten Einschlusskörpern liegt. Außerdem wurde gefunden, dass das Human-Interleukin-1 aus dem Zytosol durch eine einfache zwei- oder gegebenenfalls drei-stufige Säulen-Chromatographie gereinigt werden kann.

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Human-Interleukin-1 wird im einzelnen wie folgt durchgeführt:

Im ersten Schritt des Verfahrens erhält man eine lösliche Zellfraktion durch Aufbrechen von transformierten mikrobiellen Wirtszellen, die unter Bedingungen aufwachsen, die die Expression des eingebrachten Genes für Human-Interleukin-1 bewirken und Abtrennung des unlöslichen Zellmaterials einschließlich der Einschlusskörper, in denen gemäss Stand der Technik der grösste Teil des exprimierten Human-Interleukin-1 (rHIL-1) vorliegen soll.

Das Aufbrechen der Zellen kann durch allgemein bekannte Techniken erreicht werden, wie z.B. durch enzymatische Abbau, z.B. durch Lysozym-Behandlung, durch physikalische Spaltung unter Verwendung einer Kugelmühle oder einer ähnlichen Vorrichtung, oder vorzugsweise durch Ultraschallbehandlung. Die Abtrennung des löslichen Zytosols vom unlöslichen Zellmaterial wird am einfachsten durch Zentrifugieren, z.B. bei  $20\ 000 \times g$  während ca. 30 Minuten, erreicht. Der Überstand mit der Zytosolfraktion, welcher lösliches rHIL-1 enthält, wird dann einer Gelfiltration unterzogen, bei der eine gepufferte Salzlösung zur Elution verwendet wird. Eine für diesen Verfahrensschritt geeignete Säule ist eine Sephadryl® S-200 Säule (Pharmacia Feinchemikalien AB, Uppsala, Schweden).

Die Gel-Chromatographie-Fraktionen in der gepufferten Salzlösung, vorzugsweise in einer mit

Tris/HCl, pH 8,0 gepufferten NaCl-Lösung, die einen Protein-Stabilisator wie Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthalten kann, werden untersucht. Die kombinierten biologisch aktiven Fraktionen werden mit zusätzlicher gepufferter Salzlösung verdünnt und im zweiten Schritt des erfindungsgemässen Verfahrens verwendet.

Die Untersuchung der chromatographischen Fraktionen kann mit allgemein bekannten Methoden durchgeführt werden. Eine geeignete Analysemethode ist die Maus-Thymozytenproliferations-Analyse (LAF-Analyse) wie von Mizel et al., J. Immunol. 120, 1497-1508 (1978), beschrieben.

Der zweite Verfahrensschritt umfasst eine Ionenaustrausch-Chromatographie, vorzugsweise auf einer DEAE-Zellulose-Säule, unter Verwendung eines Gradienten von ansteigender Salzkonzentration in einer gepufferten Lösung. In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser Gradient ein 0-800 mM NaCl Gradient in 25 mM Tris/HCl, pH 8,1 Puffer.

Bei der Reinigung in grossem Massstab, werden nach dem Zentrifugieren zur Entfernung der Zellbruchstücke die Nukleinsäuren in der Zytosolfraktion durch eine Streptomycin-Sulfat-Präzipitation entfernt. Ein Zehntelvolumen (des Überstandes) einer 10% w/v Streptomycin-Sulfat-Lösung wird hinzugefügt. Der pH-Wert wird mit 1 N Essigsäure bei 6,2-6,4 gehalten. Die Suspension wird bei 20 000 × g während 30 Minuten zentrifugiert. Die Proteine in der resultierenden Überstandslösung werden durch Hinzufügen von Ammoniumsulfat, bis zu 60%-iger Sättigung, konzentriert. Die Suspension wird bei 20 000 × g während 30 Minuten zentrifugiert und das resultierende Sediment in einem Minimalvolumen 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 800 mM NaCl aufgelöst.

In einigen Fällen, insbesondere bei der Durchführung des Verfahrens in grösserem Massstab, kann die Endotoxin-Menge bei diesem Schritt über das zulässige Mass hinaus erhöht sein. Demzufolge kann gegebenenfalls ein dritter Schritt zur Entfernung des Endotoxins eingeführt werden. Allgemein bekannte Verfahren können zu diesem Zweck angewendet werden, wenngleich das bevorzugte Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung einen Durchgang der Lösung (1:1 v/v verdünnt mit 25 mM Tris/HCl, pH 8,1) von der DEAE-Säule durch eine DetoxiGel® (Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., U.S.A.) -Säule umfasst, wobei den Anweisungen des Herstellers gefolgt wird.

Das gereinigte Human-Interleukin-1 der vorliegenden Erfindung kann in bekannter Art und Weise als Pharmazeutikum verwendet werden, um das Immunsystem eines Patienten zu stimulieren, z.B. indem die Immunantwort auf Pathogene verbessert wird, indem es als Vakzin-Adjuvans wirkt und indem es die Abwehr gegen neoplastische Krankheiten verstärkt. Andere klinische Verwendungszwecke umfassen die Förderung der Wundheilung durch Stimulation des Wachstums der Fibroblasten und die Verbesserung der Genesung von kritisch kranken, proteinunterernährten Patienten.

Das Human-Interleukin-1 der vorliegenden Erfin-

dung kann warmblütigen Säugern für die oben genannten klinischen Verwendungszwecke verabreicht werden. Die Verabreichung kann durch jegliche konventionelle Methode erfolgen, wie durch parenterale Applikation entweder intravenös, subkutan oder intramuskulär. Es ist klar, dass die benötigte Dosis von den besonderen Umständen abhängt, von der Schwere der Erkrankung, der Dauer der Behandlung und der Methode der Verabreichung. Eine geeignete Dosierungsform für die pharmazeutische Verwendung kann erhalten werden, indem steril filtriertes, lyophilisiertes Human-Interleukin-1 vor der Verwendung auf bekannte Art und Weise rekonstituiert wird. Der Zusatz von Puffern, Stabilisatoren, Bakteriostatika und anderer Zusatzmittel die üblicherweise in pharmazeutischen parenteralen Dosierungsformen verwendet werden, kann gemäss dem allgemeinen Fachwissen erfolgen.

#### Beispiel 1

E. coli-Zellen, transformiert mit einem Expressionsvektor, welcher für rekombinantes Human-Interleukin-1 $\alpha$  (rHIL-1 $\alpha$ ) codiert, wurden unter Bedingungen wachsen gelassen, welche die Expression des rHIL-1 $\alpha$  erlauben. Die Zellen wurden gesammelt und gefroren. Für die Reinigung des rHIL-1 $\alpha$  wurden die gefrorenen E. coli Zellen in 30 mM Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA (in einem Verhältnis von 1:5 w/v) aufgetaut. Die resuspendierten Zellen wurden mit einem Branson Zellzertrümmerer 350 (Sonicator) aufgebrochen. Die aufgebrochenen Zellen und «unlösliches» rHIL-1 $\alpha$  in Form von Einschlusskörpern wurde durch Zentrifugation bei 20 000 × g entfernt. Der lösliche rHIL-1 $\alpha$  enthaltende Überstand wurde auf eine Sephadryl® S-200 Säule (Fig. 2) aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 mM Tris/HCl (pH 8,0), 800 mM NaCl, 5 mM EDTA äquilibriert. Die biologisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt, im Verhältnis 1:3 (v/v) mit 30 mM Tris/HCl (pH 8,0) verdünnt und auf DEAE-Zellulose (Anionen-Austauscher DE 53, Whatman Ltd.) unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0-800 mM NaCl in 25 mM Tris/HCl (pH 8,1) chromatographiert (Fig. 3). Mehr als 50% der biologischen Aktivität wurden zurückgewonnen bei einer spezifischen Aktivität von 0,4 bis 1,0 × 10<sup>7</sup> Einheiten/mg Protein. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli et al., Nature 227, 680-685 (1970), (Fig. 4), sowie mittels Umkehrphasen-HPLC bestätigt. Nach der Sephadryl® S-200 Chromatographie war das rHIL-1 $\alpha$  mit 1000-2000 Endotoxin Einheiten/ml verunreinigt aber die DEAE-Chromatographie bewirkte eine 99%ige Reduktion des Endotoxins. Die biologische Aktivität erwies sich für mindestens 3 Monate stabil, wenn das Protein bei 4°C gelagert wurde.

#### Beispiel 2

Obiges Verfahren wurde in vergrössertem Massstab durchgeführt, um 32 mg im wesentlichen reines rHIL-1 $\alpha$  herzustellen. Einhundert (100) g Zell-

masse wurde mit einem Manton-Gaulin (Meth. Enzymology 22, 482-484 [1971]) aufgeschlossen und das resultierende lösliche Produkt wurde mit Streptomycinsulfat und Ammoniumsulfat behandelt, um Nukleinsäuren zu entfernen und die Proteine zu konzentrieren. Das resultierende resolubilisierte Protein wurde in gepufferter Salzlösung an einer 10 l Sephadryl® S-200 Säule chromatographiert. Das gereinigte Material wurde dann an einer DEAE-Zellulose-Säule chromatographiert. Das Protein war zu mehr als 95% rein, wie durch SDS-PAGE festgestellt werden konnte. Die gesamte Aktivität, die erhalten wurde, betrug  $1,6 \times 10^9$  Einheiten mit einer durchschnittlichen spezifischen Aktivität von  $5 \times 10^7$  Einheiten/mg. Im Gegensatz zum eigentlichen Pilotversuch war dieses Material jedoch ein wenig mit Endotoxin verunreinigt (bis zu 500 Endotoxin-Einheiten/ml). Diese Endotoxinverunreinigung konnte leicht entfernt werden, indem die Proteinlösung über eine mit DetoxiGel® gepackte Säule geführt wurde, wobei die Anweisungen des Herstellers befolgt wurden.

#### Beschreibung der Figuren:

Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenz von Human-Interleukin-1 $\alpha$ .

Fig. 2 zeigt ein Chromatogramm der Gelfiltration von E. coli Zytosol mit löslichem rHIL-1 $\alpha$  auf Sephadryl® S-200. Das Elutionsmittel ist 30 mM Tris/HCl (pH 8,0), 800 mM NaCl. In einer Teilmenge der Fraktionen wurde mittels LAF-Analyse die Interleukin-1 Aktivität bestimmt.

Fig. 3 zeigt ein Chromatogramm der DEAE-Zellulose-Chromatographie der vereinigten Interleukin-1 aktiven Fraktionen der Sephadryl® S-200 Säule. rHIL1 $\alpha$  wurde mit einem Salz-Gradienten von 0-800 mM NaCl in 25 mM Tris/HCl (pH 8,1) eluiert. Proben jeder Fraktion wurden mittels LAF-Analyse auf biologische Aktivität geprüft.

Fig. 4 zeigt die Reinigung von rHIL-1 $\alpha$ . Proben von verschiedenen Stufen der Reinigung von rHIL-1 $\alpha$  wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

(A) M: Größen-Markierungsproteine; P: Sediment nach der Zentrifugation der Ultraschall-behandelten Zellsuspension; S: Zytosolfraktion; Fraktionen 64-69 und Fraktionen 70-77: Fraktionen 64 bis 77 der Sephadryl® S-200 Chromatographie einzeln aufgetragen (markiert durch I).

(B) M: Größen-Markierungsproteine; O: vereinigte Fraktionen der Sephadryl® S-200 Säulen-Chromatographie; O\*: vereinigte Fraktionen der Sephadryl® S-200 Säulen-Chromatographie 1:3 (v/v) verdünnt mit 30 mM Tris/HCl, pH 8,1; Fraktionen 60-65 und Fraktionen 66-73: Fraktionen 60 bis 73 der DEAE-Zellulose-Chromatographie einzeln aufgetragen (markiert durch I).

Die elektrophoretischen Mobilitäten der Größen-Markierungsproteine in M (Phosphorylase B, [ $M_r = 94\ 000$ ], Rinderserumalbumin [ $M_r = 67\ 000$ ], Ovalbumin [ $M_r = 43\ 000$ ], Carboanhydrase [ $M_r = 30\ 000$ ], Sojabohnen Trypsin-Inhibitor [ $M_r = 20\ 000$ ]

und  $\alpha$ -Lactalbumin [ $M_r = 14\ 000$ ] und deren  $M_r$ -Werte ( $\times 10^3$ ) sind mit Pfeilen markiert.

#### 5 Patentansprüche

1. Human-Interleukin-1 $\alpha$  im wesentlichen endotoxin-frei und als ein im wesentlichen homogenes Protein mit einer spezifischen Aktivität von mindestens  $5 \times 10^7$  Einheiten/mg.
2. Verfahren zur Herstellung von Human-Interleukin-1 im wesentlichen endotoxin-frei und als ein im wesentlichen homogenes Protein mit einer spezifischen Aktivität von mindestens  $5 \times 10^7$  Einheiten/mg Protein, dadurch gekennzeichnet, dass Mikrobenzellen, die mit einem Expressionsvektor transformiert sind der ein Gen für rekombinantes Human-Interleukin-1 enthält, und die zur Expression des genannten Gens induziert sind, aufgebrochen werden, unlösliches Zellmaterial von einer Zytosolfraktion abgetrennt wird und das Human-Interleukin-1 aus der Zytosolfraktion gereinigt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, worin die Mikrobenzellen mittels Ultraschallbehandlung aufgebrochen werden.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, worin das Human-Interleukin-1 durch eine zwei- oder dreistufige Säulen-Chromatographie gereinigt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 2, 3 oder 4, worin das Human-Interleukin-1 dadurch aus der Zytosolfraktion isoliert wird, dass die Zytosolfraktion unter Verwendung einer gepufferten Salzlösung einer Gelfiltration unterworfen wird, die biologisch aktiven Fraktionen der Gelfiltration vereinigt werden und diese einer Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung eines Gradienten steigender Salzkonzentration in einer gepufferten Lösung unterworfen werden.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, worin die gepufferte Salzlösung eine Tris/HCl gepufferte NaCl-Lösung ist.
7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 5 oder 6, worin die genannte Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung einer DEAE-Zellulose-Säule erfolgt und der genannte Gradient steigender Salzkonzentration in einer gepufferten Lösung ein 0-800 mM NaCl-Gradient in Tris/HCl-Puffer ist.
8. Human-Interleukin-1 im wesentlichen endotoxin-frei und als ein im wesentlichen homogenes Protein mit einer spezifischen Aktivität von mindestens  $5 \times 10^7$  Einheiten/mg Protein, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 7.
9. Human-Interleukin-1 gemäß Anspruch 8, welches Human-Interleukin-1 $\alpha$  ist.
10. Human-Interleukin-1 gemäß einem der Ansprüche 1, 8 oder 9 als pharmazeutisches Mittel.
11. Pharmazeutische Zusammensetzungen, welche ein Human-Interleukin-1 gemäß einem der Ansprüche 1, 8 oder 9 enthalten.

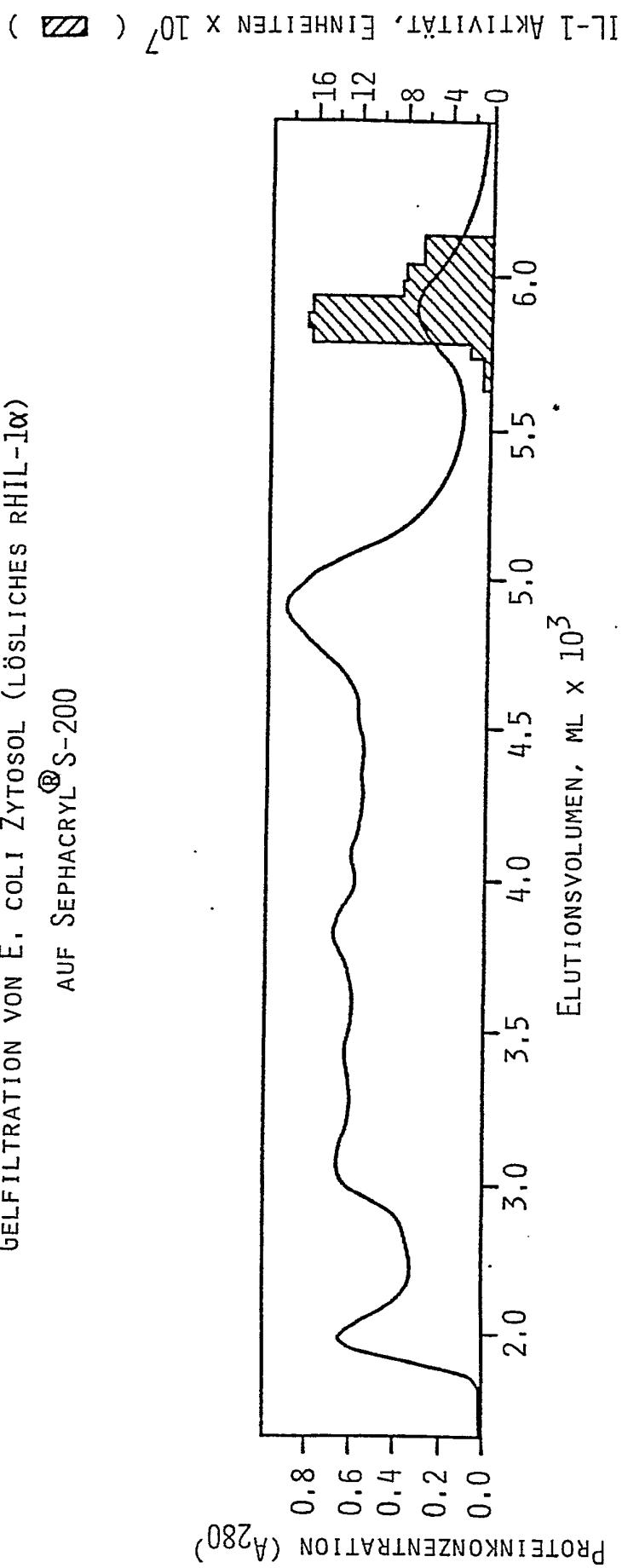
FIGUR 1

Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg Ile  
Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn  
Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr  
Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys  
Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp  
Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr  
Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro  
Val Leu Leu Lys Glu Met Pro Glu Ile Pro Lys Thr  
Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp  
Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val  
Ala His Pro Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp  
Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser Ile  
Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala

CH 676 008 A5

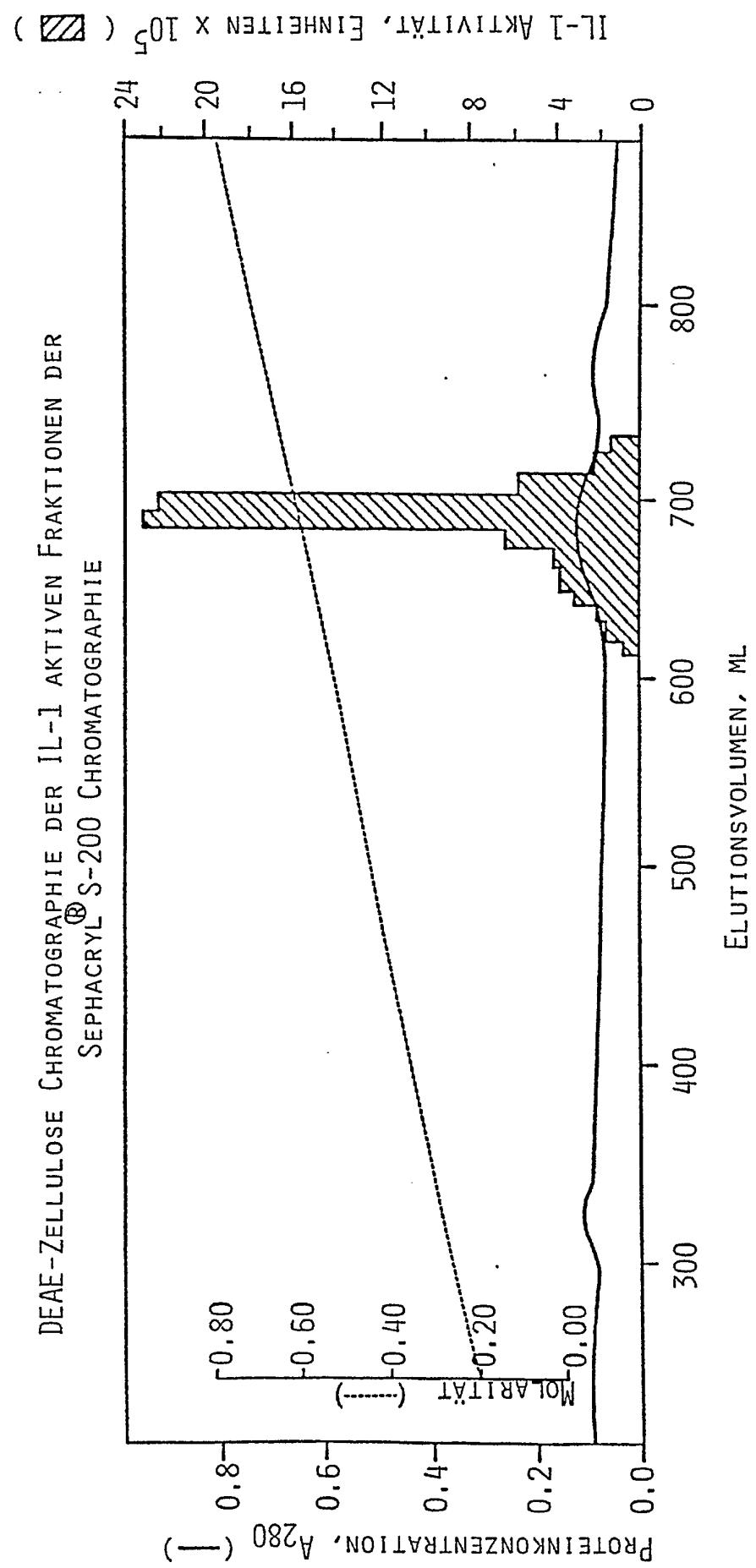
FIGUR 2

GELFILTRATION VON E. COLI ZYTOSOL (LÖSLICHES RHIL-1 $\alpha$ )  
AUF SEPHACRYL S-200



FIGUR 3

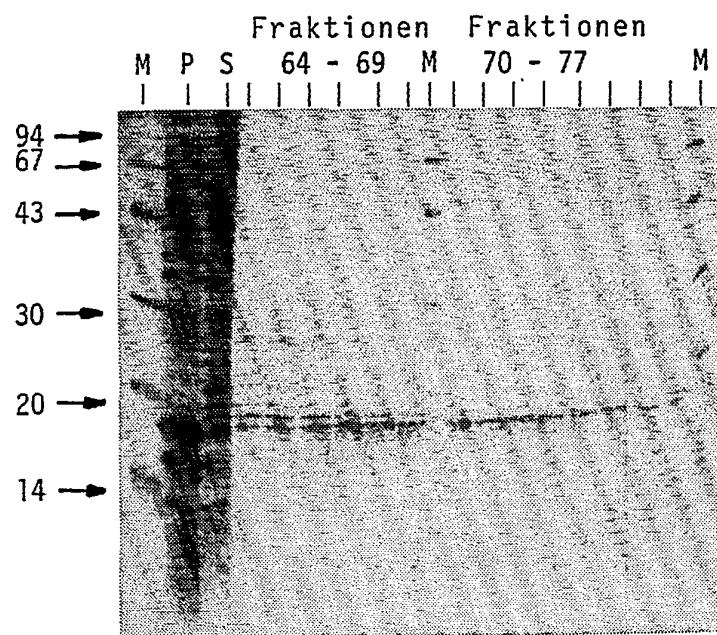
DEAE-ZELLULOSE CHROMATOGRAPHIE DER IL-1 AKTIVEN FRAKTIONEN DER  
SEPHACRYL<sup>®</sup> S-200 CHROMATOGRAPHIE



CH 676 008 A5

FIGUR 4

A



B

