

19



Octrooiraad  
Nederland

11 193099

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 8203944

51 Int.Cl.<sup>6</sup>  
A61K38/28, A61K31/66, C07F9/10

22 Ingediend: 12.10.82

30 Voorrang:  
20.07.82 DK 0003247/82  
30.10.81 DK 0004786/81

73 Octrooihouder(s):  
Novo Industri A/S te Bagsvaerd, Denemarken  
(DK).

43 Ter inzage gelegd:  
16.05.83 I.E. 83/10

74 Gemachtigde:  
Ir. L.C. de Bruijn c.s. te 2517 KZ Den Haag.

44 Openbaargemaakt:  
01.07.98 I.E. 98/07

47 Dagtekening:  
03.11.98

45 Uitgegeven:  
04.01.99 I.E. 99/01

54 Gestabiliseerde insuline-oplossing.

NL C 193099

## Gestabiliseerde insuline-oplossing

De uitvinding heeft betrekking op een fysisch gestabiliseerde insuline-oplossing, die een fosfolipide en eventueel zink, een conserveermiddel, een middel voor het isotoon maken van de oplossing en een buffer  
5 bevat.

Een dergelijke oplossing is bekend uit de Europese octrooiaanvraag 32.622. Het aldaar voorgestelde fosfolipide bevat aan de glycerylrest twee alkadinyloyl-groepen. Deze fosfolipiden dienen door middel van hun diyn-systemen voor het verknopen onder invloed van licht, ter vorming van een polymeerlaag, bijvoorbeeld op contactlenzen. Onder de vele fysiologisch werkzame materialen die volgens deze publicatie  
10 met de fosfolipiden kunnen worden gecombineerd, wordt ook insuline genoemd, zonder dat daaraan een suggestie kan worden ontleend dat de fosfolipiden in staat zouden zijn oplossingen van insuline te stabiliseren.

Uit het Amerikaanse octrooischrift 4.145.410 is een werkwijze voor het bereiden van een farmaceutische samenstelling met beheerste afgifte bekend, waarbij men een werkzame stof zoals insuline inkapselt met  
15 een fosfolipide. In dergelijke samenstellingen is geen sprake van oplossingen van insuline en zeker niet van fysisch gestabiliseerde oplossingen van insuline.

Een insuline-oplossing in bijvoorbeeld water kan enkele jaren bij omgevingstemperatuur worden bewaard; dergelijke samenstellingen zijn stabiel binnen die tijdsperiode. Wanneer echter een insuline-oplossing tot ongeveer 80°C wordt verwarmd, zal deze insuline binnen enkele minuten denatureren, welk gevolg  
20 warmte-denaturering of warmte-polymerisatie genoemd wordt. Wanneer een insuline-oplossing enkele dagen geschud wordt bij een lagere temperatuur, waarbij geen of nagenoeg geen warmte-denaturering plaats heeft, bijvoorbeeld bij 41°C, zal een andere soort polymerisatie plaats hebben, welke soort polymerisatie hierna non-covalente grensvlakpolymerisatie genoemd wordt.

Gewoonlijk bewaren insuline-fabrikanten, apothekers en patiënten insuline-preparaten bij ongeveer 5°C;   
25 blijkbaar heeft geen grensvlakpolymerisatie in dergelijke samenstellingen plaats, hoewel de preparaten tijdens transport en dragen onvermijdelijk van tijd tot tijd geschud worden.

In de laatste jaren zijn gestadig toenemende pogingen gewijd aan de ontwikkeling van draagbare en tevens implanteerbare systemen voor continue infuus van insuline. In wezen bestaat het mechanische deel van een inrichting voor continue afgifte van insuline uit elementen zoals een insuline-reservoir, een  
30 pompsysteem en een geschikte catheter voor het afgeven van insuline aan de patiënt. Wanneer de insuline-oplossing wordt toegediend door een naald, kan de naald als het insuline-reservoir functioneren.

Helaas is gebleken dat, wanneer insuline in commercieel verkrijgbare oplossingen in dergelijke systemen wordt geplaatst, de insuline de neiging heeft grensvlakpolymerisatie bij lichaamstemperatuur te ondergaan, waardoor zowel de mechanische onderdelen als de afgifte-catheters verstopping ondergaan. Gebleken is  
35 dat deze eigenschap van insuline-oplossingen een hoofdbeletsel vormt voor de verdere ontwikkeling en klinische toepassing van continue infuus-apparatuur.

Klaarblijkelijk worden in elk type continu werkende afgifte-apparatuur insuline-oplossingen onderworpen aan bewegingen, die resulteren in grensvlakpolymerisatie. De algemene tekortkomingen van bekende insuline-preparaten in dit opzicht zijn uitvoerig in de literatuur gedocumenteerd, zie bijvoorbeeld *Diabetologia*  
40 19 (1980), 1-9.

Om dit probleem op te lossen is voorgesteld zure insuline-oplossingen te gebruiken, die glutaminezuur of asparaginezuur bevatten, zie *Diabetes* 30 (1981), 83. Insuline is echter in zure oplossing chemisch niet stabiel, zelfs beneden lichaamstemperatuur. Voorts is gesuggereerd insuline-formuleringen te gebruiken, die niet-ionogene oppervlak-actieve middelen bevatten, zie de Duitse octrooiaanvraag 2.952.119. Echter zouden  
45 niet-ionogene oppervlak-actieve middelen als ongewenst in geneesmiddelen bestemd voor parenteraal gebruik, beschouwd kunnen worden.

De nadelen worden overwonnen door de onderhavige uitvinding, die nieuwe samenstellingen verschaft van opgeloste insuline, waarin de insuline aanzienlijk minder gevoelig is voor non-covalente grensvlakpolymerisatie onder omstandigheden, die in continue insuline afgifte-apparatuur heersen, dan het geval is  
50 met gebruikelijke insuline-samenstellingen.

Verrassenderwijze werd gevonden, dat insuline-oplossingen tegen grensvlakpolymerisatie gestabiliseerd worden, wanneer ten minste één fosfolipide van het hierna gewenste type in de oplossing aanwezig is.

De onderhavige uitvinding verschaft een oplossing van het in de aanhef vermelde type, die als kenmerk heeft, dat het fosfolipide voldoet aan de formule van het formuleblad, waarin R' en R'' gelijk of verschillend  
55 zijn en elk een alkanoyl-, een alkenoyl-, een alkadienoyl-, een alkatrienoyl- of een alkatetraenoylgroep voorstellen, en één van R' en R'' ook een waterstofatoom kan voorstellen, en R'' ' een hydrofiële groep voorstelt.

Voorbeelden van hydrofiële groepen zijn een 2-(trimethylammonio)ethyl-, een 2-aminoëthyl-, een 2-carboxy-2-aminoëthyl-, een 2,3-dihydroxypropyl- en een 2, 3, 4, 5, 6-pentahydroxycyclohexylgroep. De hiervoor vermelde alkanoyl-, alkenoyl-, alkadiëntl-, alkatriënyl- en alka-tetraïnoylgroepen bevatten bij voorkeur 8 tot 22 en met meer voorkeur 12 tot 22 koolstofatomen.

5 Een subklasse van de verbindingen met de formule van het formuleblad, die de voorkeur verdient, wordt gevormd door verbindingen, waarin R' en R'' elk een alkanoylgroep voorstellen. Een andere subklasse, die de voorkeur verdient, wordt gevormd door verbindingen, waarin R'' ' een 2-(trimethylammonio)ethylgroep voorstelt, welke verbindingen als lecithinen bekend zijn. Een verdere voorkeur is voor verbindingen met de formule van het formuleblad, waarin R' en R'' elk een alkanoylgroep met 8 tot 16 koolstofatomen of 12 tot 10 16 koolstofatomen voorstellen en R'' ' een 2-(trimethylammonio)ethylgroep voorstelt. De subklasse met de meeste voorkeur wordt gevormd door verbindingen waarin R' en R'' elk een octanoylgroep voorstellen. Verbindingen met de formule van het formuleblad, waarin R' en R'' elk een octanoylgroep voorstellen, verdienen de voorkeur omdat zij geen liposomen schijnen te vormen en zij voorts bij lagere concentraties, bijvoorbeeld beneden ongeveer 160 µg/ml, geen micellen schijnen te vormen.

15 Bij voorkeur ligt de hoeveelheid van een fosfolipide met de formule van het formuleblad, noodzakelijk voor het stabiliseren van een insuline-oplossing, in het traject van 10 tot 200 µg/ml, met meer voorkeur van 10 tot 100 µg/ml, met nog meer voorkeur van 25 tot 75 µg/ml en met de meeste voorkeur van 30 tot 50 µg/ml, betrokken op de insuline-oplossing. De concentratie van opgeloste insuline in de oplossingen van de onderhavige uitvinding ligt in het traject van 5 tot 1000 internationale eenheden (I.U.) per ml of zelfs hoger.

20 Sommige van de gestabiliseerde insuline-oplossingen bereid volgens de voorbeelden, die verderop worden gegeven, kunnen liposomen bevatten. Echter zullen dergelijke liposomen waarschijnlijk geen ingekapselde insuline bevatten, omdat zij gevormd worden voordat insuline wordt toegevoegd.

25 Wanneer liposomen aanwezig zijn in de insuline-oplossingen van de onderhavige uitvinding, verdient het de voorkeur, dat de insuline in hoofdzaak gescheiden van de liposomen aanwezig is. De uitdrukking "in hoofdzaak" betekent hier dat bij voorkeur meer dan 90% en met de meeste voorkeur meer dan 99% van de insuline gescheiden van de liposomen aanwezig is.

Liposomen, die daarin ingekapseld insuline bevatten, kunnen zoals bekend, zie bijvoorbeeld de Europese octrooiaanvraag 32.622, onderscheiden worden van de praktijk van de onderhavige uitvinding door het doel en doordat de insuline-oplossingen van de onderhavige uitvinding aanwezigheid van insuline dat eventueel 30 door een liposoom-drager ingekapseld is, slechts toevallig is. Terwijl de insuline-oplossingen van de onderhavige uitvinding bestemd zijn voor parenterale toediening, is de principiële basis voor het inkapselen van insuline in liposomen orale toediening. Een oogmerk van liposomen, die daarin ingekapseld insuline bevatten, is het beschermen van de insuline ongewenste chemische aantasting, bijvoorbeeld chemische ontleding van de insuline in de maag, wanneer insuline oraal wordt toegediend. De artikelen, die betrekking 35 hebben op liposomen, die daarin ingekapseld insuline bevatten, hebben in geen enkel opzicht betrekking op een fysische stabilisatie van insuline-oplossingen tegen grensvlakpolymerisatie. In bekende liposomen, die ingekapseld insuline bevatten, ligt de gewichtsverhouding tussen het fosfolipide en insuline bijvoorbeeld in het traject van 1:0,01 tot 1:0,001, terwijl voor de insuline-oplossingen van de onderhavige uitvinding de gewichtsverhouding bij voorkeur in het traject van 1:5 tot 1:10.000, bij voorkeur van 1:10 tot 1:1000 ligt.

40 Het Duitse Offenlegungsschrift 2.652.636 heeft betrekking op een werkwijze voor het stabiliseren van gevoelige proteïnen door toevoeging van beschermende verbindingen met een amfiofiële structuur. In tegenstelling tot de onderhavige uitvinding wordt de stabilisatie volgens dit Offenlegungsschrift verkregen door het gevoelige proteïne zodanig te omgeven, dat het beschermd is tegen contact met water. Voorts wordt volgens de terminologie in het Offenlegungsschrift insuline niet beschouwd als een gevoelig proteïne.

45 Een oogmerk van de onderhavige uitvinding is het insuline in aanraking met water, dat wil zeggen in oplossing, te houden en te verhinderen, dat het insuline met andere grensvlakken in aanraking komt.

De insuline-oplossingen van de onderhavige uitvinding bevatten bij voorkeur runder-, varkens- of menselijke insuline.

50 Bij een voorkeursuitvoeringsvorm bevat de insuline-oplossing van de onderhavige uitvinding zink. De hoeveelheid zink dient echter zodanig gekozen te worden, dat geen precipitatie plaats heeft. Een goede stabiliteit tegen grensvlakpolymerisatie wordt verkregen in insuline-oplossingen, waarin de verhouding tussen de molaire concentratie van zinkionen bij de beschikbaarstelling van insuline en de molaire concentratie van insuline berekend als hexameer-insuline in het traject van ongeveer 1,5 tot 4,6, bij voorkeur van ongeveer 3 tot 4,5 en het meest bij voorkeur van ongeveer 3,6 tot 4,3 is. Zinkzouten, die de 55 voorkeur verdienen, zijn oplosbare zinkzouten zoals zinkacetaat of zinkchloride. Wanneer de insuline-oplossing van de onderhavige uitvinding verbindingen bevat, die complexen vormen met insuline, zoals een aminozuur, bijvoorbeeld glycine of histidine, of een hydroxycarbonzuur, bijvoorbeeld citroenzuur, staat

slechts een deel van het totale zinkgehalte ter beschikking van insuline.

Een voorbeeld van een bereidingswijze van de insuline-oplossingen van de onderhavige uitvinding omvat het oplossen van insuline, bijvoorbeeld kristallijne zinkinsuline, bijvoorbeeld een zeer gezuiverde kwaliteit insuline, zoals "monocomponent" insuline, zie Brits octrooischrift 1.285.023, in water bij aanwezigheid van 5 zuur, bijvoorbeeld zoutzuur. Een waterige oplossing van een conserveermiddel, bijvoorbeeld fenol, een alkylfenol, zoals cresol of methyl-p-hydroxybenzoesuur wordt afzonderlijk bereid, en bevat desgewenst een middel, dat de oplossing isotoon maakt, zoals natriumchloride of glycerol. Voorts kan de conserveermiddel-oplossing een buffer, zoals natriumorthofosfaat, natriumcitraat, natriumacetaat of TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethaan) bevatten. De verkregen conserveermiddeloplossing wordt vervolgens desgewenst toegevoegd aan de zure insuline-oplossing, gevolgd door toevoeging van een base, bijvoorbeeld een 10 natriumhydroxide-oplossing, om de pH-waarde op neutraal te regelen. Binnen de context van de onderhavige uitvinding wordt onder neutraliteit een pH-waarde verstaan in het traject van 6,5 tot 8. Het fosfolipide met de formule van het formuleblad kan aan de insuline-oplossing worden toegevoegd als een oplossing of een colloïdale oplossing, die bereid is door het fosfolipide met de formule van het formuleblad in water op te 15 lossen of te suspenderen en desgewenst een eventuele suspensie te onderwerpen aan een ultrasone behandeling voordat met de insuline-oplossing gemengd wordt. De fosfolipide-oplossing kan desgewenst een buffer en een conserveermiddel bevatten. Na het mengen met het fosfolipide kan de pH-waarde van de insuline-samenstelling opnieuw op neutraal worden ingesteld. Tenslotte wordt de verkregen insuline-oplossing op het berekende volume gebracht door toevoeging van water, daarna wordt door filtratie 20 gesteriliseerd en vervolgens wordt aseptisch overgebracht naar steriele flesjes, die vervolgens worden afgedicht.

Sommige verbindingen met de formule van het formuleblad zijn bekend en de overige verbindingen met deze formule kunnen analoog aan de bereiding van bekende verbindingen bereid worden.

Verdere details over de uitvoering van de onderhavige uitvinding worden door middel van de volgende 25 voorbeelden verschaft. Het in de voorbeelden gebruikte uitganginsuline-materiaal bevatte ongeveer 20 tot 35 µg zink per mg stikstof. De stabiliteitsfactor werd als volgt bepaald.

Teneinde de stabiliteit van insuline-oplossingen tegen grensvlakpolymerisatie te bepalen, werden deze oplossingen op de volgende wijze aan een stabiliteitsproef onder geforceerde omstandigheden onderworpen.

30 Flesjes met een inhoud van 12,5 ml, die 10 ml van het proefmonster bevatten, en elk waren voorzien van een rubber dop, werden verticaal op een schudplatform geplaatst (geleverd door HETO, Denemarken), dat totaal was ondergedompeld in een waterbad, dat op  $41 \pm 0,1^\circ\text{C}$  werd gehouden. Het platform werd aan horizontale schudbewegingen onderworpen met een frequentie van 100 bewegingen per minuut en een amplitude van 50 mm.

35 De opalescentie van de proefmonsters werd met regelmatige tijntervallen gevolgd op een "Fischer DRT 1000 nefelometer" (geleverd door Fischer, Canada). Er werd aangenomen dat er grensvlakpolymerisatie had plaats gevonden, wanneer de troebeling 10 nefelometrische troebelingseenheden (NTU) overschreed.

De stabiliteitsfactor werd berekend als de verhouding van de grensvlakpolymerisatietijd van het proefmonster tot die van een controlemonster, op dezelfde wijze bereid als het proefmonster, met dien 40 verstande, dat geen verbinding met de formule van het formuleblad aan het controlemonster was toegevoegd.

#### *Voorbeeld I*

500 mg semi-synthetisch menselijke insuline werd in 10 ml 0,045N zoutzuur opgelost en 359 mg methyl-p- 45 hydroxybenzoesuur, opgelost in 300 ml gedestilleerd water, werd toegevoegd. Voorts werden 476 mg natriumacetaatrihydraat, 2,46 g natriumchloride en 4,73 ml van een 0,2N natriumhydroxide-oplossing, opgelost in 15 ml gedestilleerd water, toegevoegd. 9 mg dimyristoyl-L- $\alpha$ -fosfatidylcholine werd gesuspenderd in 10 ml van een oplossing van 70 mg natriumchloride, 13,6 mg natriumacetaat en 10 mg methyl-p-hydroxybenzoesuur in gedestilleerd water. Stikstof werd door de suspensie geborrelt, die gedurende twee uur 50 in een ultrasoon bad aan een ultrasone behandeling werd onderworpen. De verkregen colloïdale oplossing werd onder roeren aan de insuline-oplossing toegevoegd. De pH-waarde werd op 7,45 ingesteld met 0,2N zoutzuur of een 0,2N natriumhydroxide-oplossing en gedestilleerd water werd tot 350 ml toegevoegd. De stabiliteitsfactor van de verkregen insuline-oplossing was groter dan 125.

#### *Voorbeeld II*

9,65 g varkensinsuline werd in 400 ml 0,02N zoutzuur opgelost en 5,0 g kristallijn fenol en 400 g waterrij glycerol werden toegevoegd en voorts werd gedestilleerd water tot 2200 ml toegevoegd. De pH-waarde

werd op 7,45 ingesteld met een 0,2N natriumhydroxide-oplossing. 125 mg distearoyl-L- $\alpha$ -fosfatidylcholine werd door voorzichtig verwarmen in 2 ml ethanol (96%) opgelost en werd via een hypodermische injectie-naald geïnjecteerd in 100 ml gedestilleerd water met een temperatuur van 70°C. Hierbij werd het water krachtig geroerd. De verkregen, troebele oplossing werd gedurende 15 minuten aan een ultrasone  
5 behandeling onderworpen met een ultrageluidstift van hoge energie en de verkregen colloïdale oplossing werd onder roeren aan de insuline-oplossing toegevoegd en gedestilleerd water werd tot 2500 ml toegevoegd. De pH-waarde werd indien noodzakelijk opnieuw op 7,45 ingesteld. De stabiliteitsfactor was groter dan 30.

10

*Voorbeelden III tot VIII*

Insuline-oplossingen werden op analoge wijze als beschreven in voorbeeld I bereid, met dien verstande, dat de gebruikte fosfolipiden lecithinen waren, waarin de hydrofobe delen, dat wil zeggen R' en R'', identiek en zoals in tabel A vermeld, waren. De resultaten zijn eveneens in tabel A opgenomen.

15

TABEL A

Voorbeeld nr.	R' en R''	Insulinesoorten	Stabiliteitsfactor
20 III	myristoyl	varken	>120
IV	palmitoyl	varken	104
V	stearoyl	varken	>117
VI	lauroyl	mens	>133
VII	myristoyl	mens	>133
25 VIII	palmitoyl	mens	75

*Voorbeeld IX*

Een insuline-oplossing werd analoog aan de in voorbeeld I beschreven werkwijze bereid, met dien  
30 verstande, dat het gebruikte fosfolipide eilecithine was en het gebruikte insuline varkensinsuline was. De stabiliteitsfactor was 96.

*Voorbeelden X tot XIV*

Insuline-oplossingen werden analoog aan de in voorbeeld I beschreven werkwijze bereid, met dien  
35 verstande, dat varkensinsuline werd toegevoegd in een hoeveelheid, die de in tabel B vermelde concentratie geeft. De resultaten zijn eveneens in tabel B opgenomen.

TABEL B

Voorbeeld nr.	Insuline, I.U./ml	Stabiliteitsfactor
X	20	>120
XI	40	>120
XII	100	97
45 XIII	200	79
XIV	500	53

*Voorbeeld XV*

50 1,50 g varkensinsuline werd in 6,5 ml 2N zoutzuur opgelost en water werd tot 50 ml toegevoegd. 1,0 g methyl-p-hydroxybenzoesuur en 1,78 g natriumfosfaat werden in 900 ml gedestilleerd water opgelost en de insuline-oplossing werd toegevoegd. De pH-waarde werd met een 0,2N natriumhydroxide-oplossing op 7,45 ingesteld. Een colloïdale dimyristoyl-L- $\alpha$ -fosfatidylcholine-oplossing, die analoog aan de in voorbeeld II beschreven werkwijze bereid was, werd tezamen met gedestilleerd water toegevoegd voor het verkrijgen  
55 van een eindconcentratie van fosfolipide van 50  $\mu$ g/ml, waarbij het gedestilleerde water het geheel op 1000 ml bracht. De stabiliteitsfactor was groter dan 30.

Een insuline-oplossing werd analoog aan voorbeeld XV bereid, met dien verstande, dat de eindoplossing 20 I.U. insuline per ml bevatte. De stabiliteitsfactor was groter dan 17.

5 Voorbeeld XVII

Een insuline-oplossing werd analoog aan voorbeeld XV bereid, met dien verstande, dat de eindinsuline-concentratie 500 I.U./ml was en het eindgehalte dimyristoyl-L- $\alpha$ -fosfatidylcholine 50  $\mu$ g/ml was. De stabiliteitsfactor was groter dan 30.

10 Voorbeelden XVIII tot XX

Insuline-oplossingen werden analoog aan voorbeeld II beschreven werkwijze bereid, met dien verstande, dat dimyristoyl-L- $\alpha$ -fosfatidylcholine werd gebruikt voor het verkrijgen van de eindconcentratie zoals vermeld in tabel C. De resultaten blijken eveneens uit tabel C.

15

TABEL C

Voorbeeld nr.	Dimyristoylverbinding, $\mu$ g/ml	Stabiliteitsfactor
XVIII	1	1,3
20 XIX	10	1,8
XX	50	>33

Voorbeeld XXI

25 Dioctanoyl-L- $\alpha$ -fosfatidylcholine werd in gedestilleerd water opgelost en werd in een voldoende hoeveelheid voor het verkrijgen van een eindconcentratie van 30  $\mu$ g/ml toegevoegd aan een insuline-oplossing, die analoog aan de insuline-oplossing van voorbeeld I werd bereid. De stabiliteitsfactor was groter dan 63.

Voorbeeld XXII

30 3,65 g semi-synthetische menselijke insuline werd in 100 ml 0,02N zoutzuur en 2,0 g kristallijn fenol opgelost. 16 g watervrij glycerol en 0,3 ml van een zinkchloride-oplossing, die 4% zink bevatte, werden toegevoegd en voorts werd gedestilleerd water tot 900 ml toegevoegd. De pH-waarde werd op 7,45 ingesteld met een 0,2N natriumhydroxide-oplossing. 50 mg dioctanoyl-L- $\alpha$ -fosfatidylcholine werd in gedestilleerd water opgelost en aan de oplossing toegevoegd. Gedestilleerd water werd tot 1000 ml toegevoegd. De stabiliteitsfactor was 65.

**Conclusies**

- 40 1. Fysisch gestabiliseerde insuline-oplossing, die en fosfolipide en eventueel zink, een conserveermiddel, een middel voor het isotoon maken van de oplossing en een buffer bevat, met het kenmerk, dat het fosfolipide voldoet aan de formule van het formuleblad, waarin R' en R'' gelijk of verschillend zijn en elk een alkanoyl-, een alkenoyl-, een alkadiënoyl-, een alkatriënoyl- of een alkatetraënoylgroep voorstellen, en één van R' en R'' ook een waterstofatoom kan voorstellen, en R'' ' een hydrofiele groep voorstelt.
- 45 2. Insuline-oplossing volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de alkanoyl-, alkenoyl-, alkadiënoyl-, alkatriënoyl- en alkatetraënoyl-groepen 8 tot 22 koolstofatomen bevatten.
3. Insuline-oplossing volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat R'' ' een 2-(trimethylammonio)ethylgroep voorstelt.
4. Insuline-oplossing volgens een van de conclusies 1-3, met het kenmerk, dat de concentratie van het fosfolipide tussen 10 en 200  $\mu$ g/ml ligt.
- 50 5. Insuline-oplossing volgens een van de conclusies 1-4, met het kenmerk, dat de gewichtsverhouding tussen het fosfolipide en de insuline tussen 1:5 en 1:10.000 ligt.

Hierbij 1 blad tekening

