



# Kvalitetsmätning av insulin med NMR-teknik

Gun Forsander  
Anders Bay Nord



HASSELBLADSLABORATORIET





# BAKGRUND

Insulin är :

- Dyrt
- Svårtillgängligt
- Känsligt för hur det förvaras
- Livsnödvändigt!



## DYRT:

- Sverige: Kostnadsfritt insulin var en av kampgnistorna som startade ”Riksförbundet för sockersjuka” 1943. Förbundet pressade makthavare om hur ”det är ovärdigt att vissa diabetiker är tvungna att vända sig till fattigvården för att få sitt livsnödvändiga insulin”. 1955 blev insulinet gratis, mycket tack vare förbundets stridbara ordförande riksdagspolitikern Nancy Eriksson. *Källa: Sv Diabetsförbundet*
- ”A 2021 analysis by the RAND Corporation examined the cost of insulin in 33 nations of comparable income levels. The average list price of a single vial of insulin equated to US \$6.94 in Australia, \$7.52 in the UK, and \$14.40 in Japan. In the USA, it was \$98.70, almost four times as much as the next most expensive country, Chile (\$21.48 per vial)”. *Lancet Diabetes Endocrinol 2023 T Burki*
- Mer än hälften av en familjs samlade inkomst kan krävas för att förse en familjemedlem med insulin och hjälpmedel av enklaste slag i ett utvecklingsland. Miljontals barn och vuxna är för sin överlevnad helt beroende av stöd från ideella organisationer, ex Life For A Child.



# SVÅRTILLGÄNGLIGT:

Situationen i LRS (= Limited Resource Settings)

- Limited availability of insulin, often none of glucagon,
- Limited availability of BG testing supplies,
- Inadequate educational resources in local languages,
- Geographical distance and transport issues.

*Virmani A, Brink SJ, Middlehurst A, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Management of the child, adolescent, and young adult with diabetes in limited resource settings. Pediatr Diabetes. 2022; 23(8):1529-1551.*





# KÄNSLIGT FÖR HUR DET FÖRVARAS:

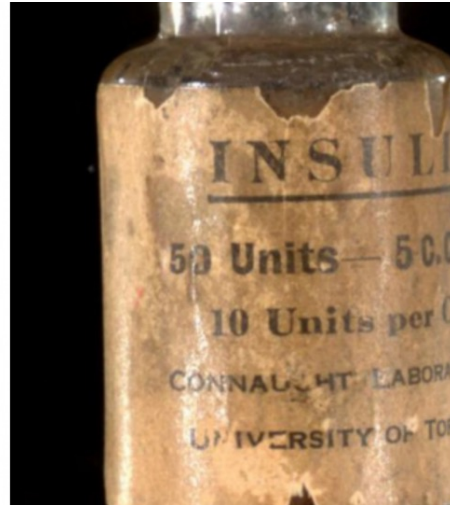
- "Insulin is temperature sensitive, with potency reduced through rising temperatures. Insulin manufacturers and regulatory agencies direct that insulin be refrigerated (at 4–6°C), never frozen, and with a maximum usage or storage period of approximately one month at standard room temperatures (20–25°C). This requirement is especially challenging in hot climate settings if home refrigeration is unavailable, which is the case for some 770 million people. Furthermore, in some situations, insulin must also be stored for a few months due to clinic visit frequency, travel costs, and intermittent pharmacy supplies. In response to this, many families use evaporative cooling with clay pots to assist in reducing insulin storage temperatures, by storing insulin within an air-filled space or a sealed bag in clay pots

*Sanket Pendsey, Steven James, Timothy J Garrett, Anders Bay Nord, Sharad Pendsey, Daniel Malmodin, Göran Karlsson, Jayanthi Maniam, Mark A Atkinson, Gun Forsander, Graham D Ogle . Lancet Diabetes-Endocrinology Vol 11 May 2023*



UNIVERSITY OF  
GOTHENBURG

# LIVSNÖDVÄNDIGT!



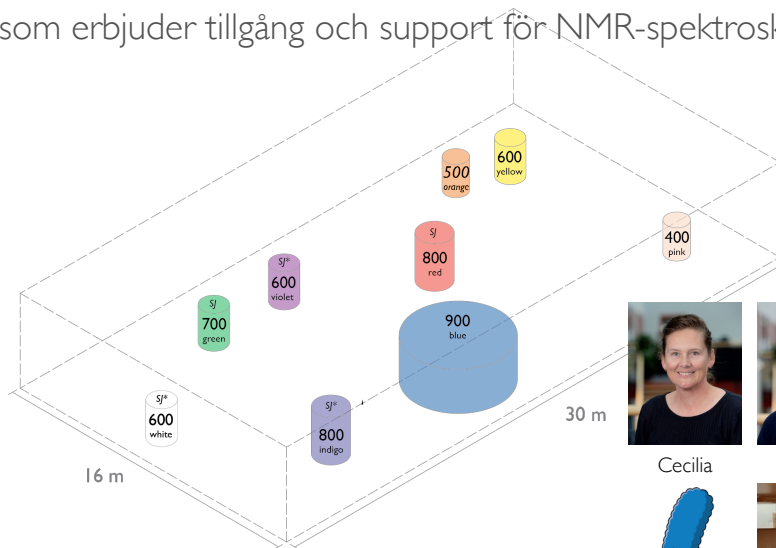


UNIVERSITY OF  
GOTHENBURG

# Svenskt NMR-centrum vid Göteborgs Universitet

= forskningsinfrastruktur som erbjuder tillgång och support för NMR-spektroskopi

## Personal



Göran



Vladislav



Cecilia



Anders



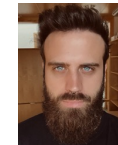
Daniel



Ashish



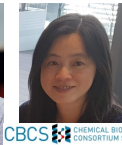
Vakant



Arthur



Ulrika



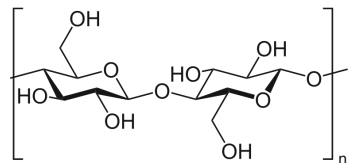
Weixiao

Strukturbiologi  
Metabolomik  
Materialvetenskap  
Kemisk biologi

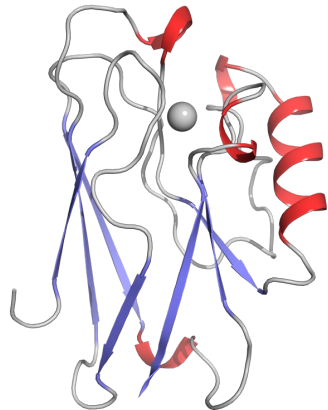




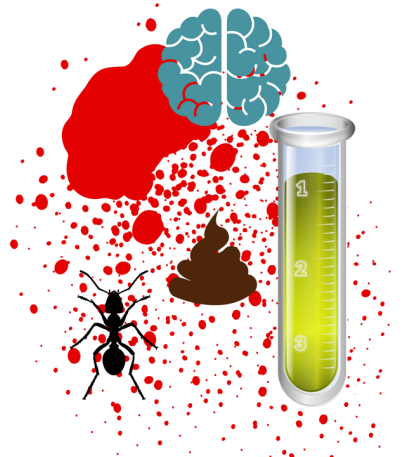
# Svenskt NMR-centrum vid Göteborgs Universitet



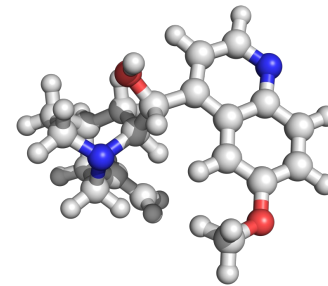
cellulosa



azurin



serum/plasma/helblod,  
urin, CSF, fekalievatten,  
extrakt



kinin

material

proteiner & nukleinsyror

biovätskor

småmolekyler





- ▶ Insulinintroduktion
- ▶ Projekt 1: insulin och NMR som QC-teknik
- ▶ Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet



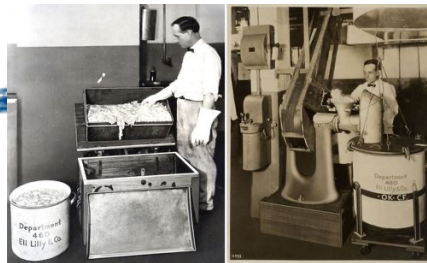
UNIVERSITY OF  
GOTHENBURG

# Insulin från naturlig källa



2 ton bukspottkörtel

225 g insulin



Inspektion, malning

Extraktion med etanol  
Utfällning  
Formulering



Filtrering, paketering

<https://americanhistory.si.edu/blog/2013/11/two-tons-of-pig-parts-making-insulin-in-the-1920s.html>



# Insulin från GMM

- Insulin den första s.k. 'biological'
- Superexempel på hur bioteknik använts framgångsrikt

human wt insulin (Humulin, Actrapid)

α 1 GIVEQCC**TSI**CSLYQLENY**CN** 21

β 1 FVNQHL**CG**SHLVEALYLV**CG**GERGFFYTPKT 30

*kortverkande*

insulin aspart (Novorapid)

α 1 GIVEQCC**TSI**CSLYQLENY**CN** 21

β 1 FVNQHL**CG**SHLVEALYLV**CG**GERGFFY**TDKT** 30

*snabbverkande*

lispro (Humalog)

α 1 GIVEQCC**TSI**CSLYQLENY**CN** 21

β 1 FVNQHL**CG**SHLVEALYLV**CG**GERGFFY**TKPT** 30

*snabbverkande*

glargin (Lantus, Basaglar)

α 1 GIVEQCC**TSI**CSLYQLENY**CG** 21

β 1 FVNQHL**CG**SHLVEALYLV**CG**GERGFFYTPKT**RR** 32

*långverkande*

1982

2000

1996

2000



*E. coli*



*S. cerevisiae*



# Insulinformulering

## FASS Allmänhet

Bipacksedel: Information till användaren

### NovoRapid

100 enheter/ml injektionsvätska, lösning i injektionsflaska  
Insulin aspart

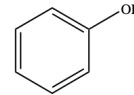
### 6. Förpackningens innehåll och övriga upplysningar

#### Innehållsdeklaration

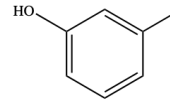
- Den aktiva substansen är insulin aspart. Varje ml innehåller 100 enheter insulin aspart. Varje injektionsflaska innehåller 1 000 enheter insulin aspart i 10 ml injektionsvätska.
- Övriga innehållsämnen är glycerol, fenol, metakresol, zinkklorid, dinatriumfosfatdihydrat, natriumklorid, saltsyra, natriumhydroxid och vatten för injektionsvätskor.

insulinmutant...GMM har använts

vanlig stabilisator för proteiner



antimikrobiella substanser



Zn<sup>2+</sup> bindande protein

fosfatbuffert, pH-justerad



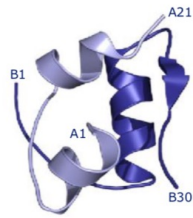




# Insulins olika former

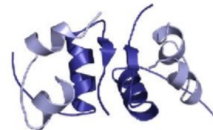
## Human Insulin self-association forms

Monomer



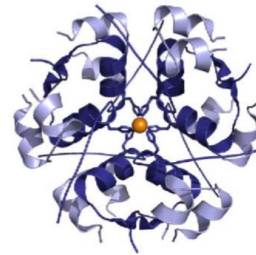
- Circulation in blood stream
- Receptor binding

Dimer



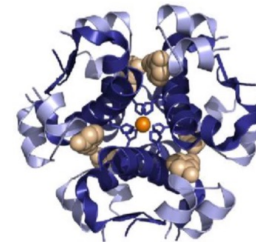
- Building block for hexamer

T<sub>6</sub> hexamer  
2 Zn<sup>2+</sup>/6 insulin



- Crystalline storage in  $\beta$ -cells granula *in vivo*

R<sub>6</sub> hexamer  
2 Zn<sup>2+</sup>/6 insulin  
6 phenol/6 insulin  
B1-B8 convert to  $\alpha$ -helix



- Pharmaceutical formulation (with additional excipients)



Partially unfolded structure



Denatured peptide



Nucleus

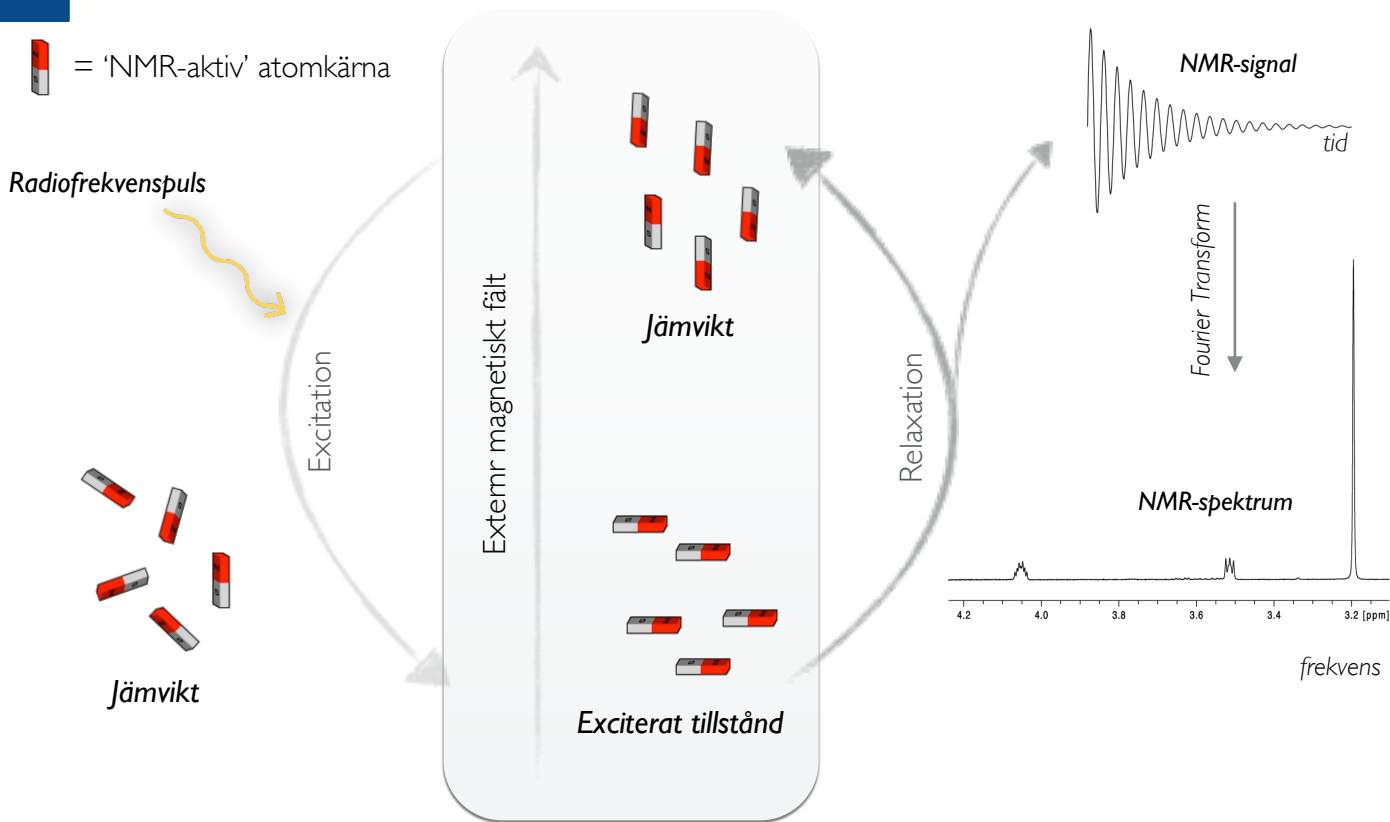


PubMed: Insulin AND amyloid ger 4907 träffar...

...eventuella biverkningar av fenoler 'bättre' än framtida amyloidsjukdom(?)

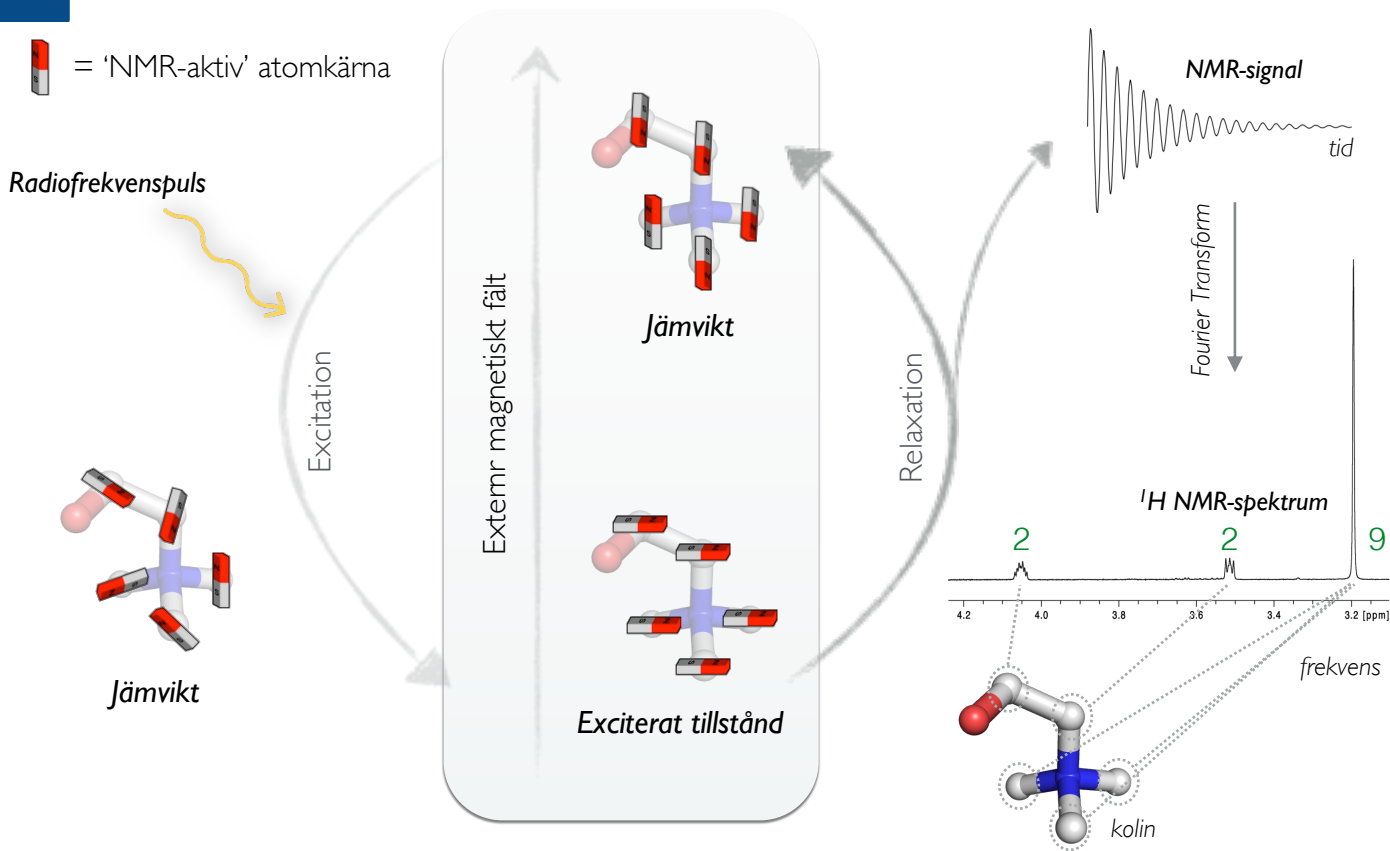


# NMR-spektroskopi på en slide





# NMR-spektroskopi på en slide





# NMR-spektroskopi på en slide

 = 'NMR-aktiv' atomkärna

Radiofrekvenspuls

kt fält

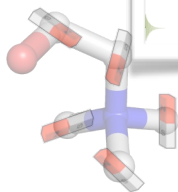
Jämvikt

NMR-signal

tid

rier Transform

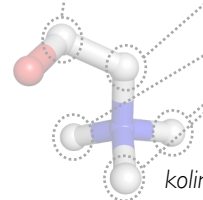
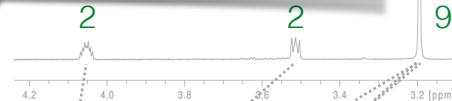
- ▶ NMR-signalens integral ('arean under grafen') direkt proportionell mot koncentration = absolutkvantifiering möjlig
- ▶ Skillnader i mikromiljön kring atomkärnor ger olika resonansfrekvenser



Jämvikt

EX

Exciterat tillstånd



kolin



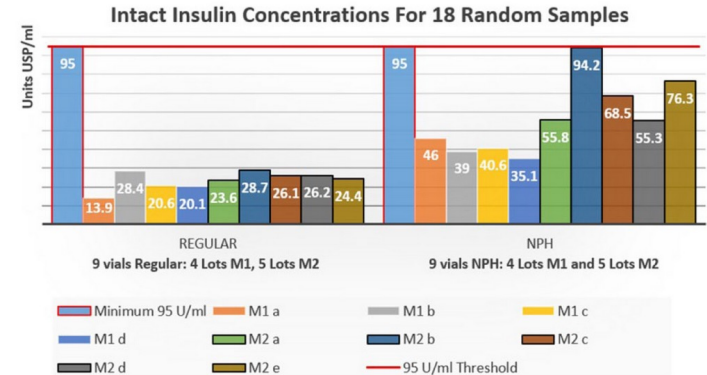
## Technology Reports

### Insulin Concentration in Vials Randomly Purchased in Pharmacies in the United States: Considerable Loss in the Cold Supply Chain

Alan W. Carter, PharmD<sup>1,2</sup> and Lutz Heinemann, PhD<sup>3</sup>

#### Abstract

The insulin content in vials/cartridges should be 95 U/ml upon release. No independent confirmation of insulin concentration is available when purchased in the pharmacy (end of the cold supply chain). We quantitatively measured intact insulin in randomly acquired multidose human insulin vials by **standard analytical methods**. Eighteen 10 ml vials from two manufacturers (M1 and M2) were randomly acquired. The intact insulin concentration ranged from 13.9 to 94.2 U/ml, mean 40.2 U/ml. No vial met the minimum standard of 95 U/ml. These results imply the cold supply chain impacts insulin concentrations to a larger extent than anticipated. Patients are paying high prices for insulin and should expect to receive insulin vials with adequate insulin content in return.



**Figure 2.** The 95 U/ml minimum outlined in red and the 95 U/ml threshold red line represent the smallest concentration of intact insulin allowed by the FDA for release by the manufacturer. N = 18, range = 13.9-94.2 U/ml, mean = 40.2 U/ml. To deidentify manufacturer source samples are labeled REGULAR M1 (a-d) and REGULAR M2 (a-e); NPH M1 (a-d) and NPH M2 (a-e).

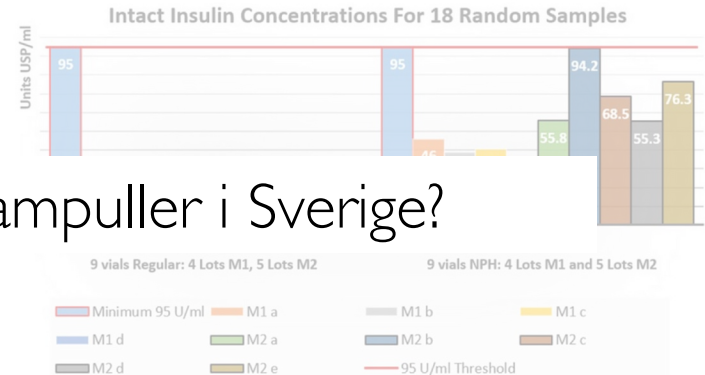
Technology Reports

## Insulin Concentration in Vials Randomly Purchased in Pharmacies in the United States: Considerable Loss in the Cold Supply Chain

Alan W. Carter, PharmD<sup>1,2</sup> and Lutz Heinemann, PhD<sup>3</sup>

Abstract

The insulin content in vials/cartridges should be 95 U/ml upon release. No independent confirmation of insulin concentration is available when purchased in the pharmacy (end of the cold supply chain). We quantitatively measured intact insulin in randomly acquired multidose human insulin vials by **standard analytical methods**. Eighteen 10 ml vials from two manufacturers (M1 and M2) were randomly acquired. The intact insulin concentration ranged from 13.9 to 94.2 U/ml, mean 40.2 U/ml. No vial met the minimum standard of 95 U/ml. These results imply the cold supply chain impacts insulin concentrations to a larger extent than anticipated. Patients are paying high prices for insulin and should expect to receive insulin vials with adequate insulin content in return.



**Figure 2.** The 95 U/ml minimum outlined in red and the 95 U/ml threshold red line represent the smallest concentration of intact insulin allowed by the FDA for release by the manufacturer. N = 18, range = 13.9-94.2 U/ml, mean = 40.2 U/ml. To deidentify manufacturer source samples are labeled REGULAR M1 (a-d) and REGULAR M2 (a-e); NPH M1 (a-d) and NPH M2 (a-e).

# Projekt 1: insulin och NMR som QC-teknik

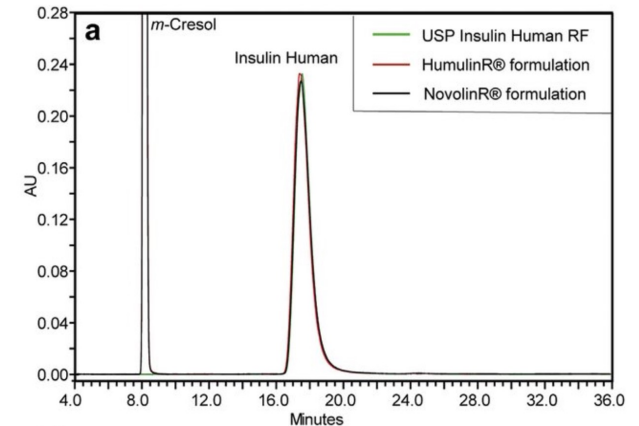
prov	analytisk teknik	output
surgjort, monomeriserat insulin	LC-UV	▶ koncentration av nativt och kemiskt förändrat insulin
surgjort, monomeriserat insulin	LC-MS	▶ koncentration av nativt och kemiskt förändrat insulin
farmaceutiska formuleringen + D <sub>2</sub> O	NMR	▶ koncentration insulin och excipienter ▶ innehåll ▶ strukturinformation



# Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik

## LC-UV: USP 41, 'Insulin Human Injection' SOP

- ▶ 1.5 mg/ml insulin i 0.01 M HCl (→ insulinmonomerisering)
- ▶ vätskekromatografi på reverse phase kolonn
- ▶ UV-absorbansdetektion vid 214 nm (peptidbindning)
- ▶ Integralen av toppen → koncentration



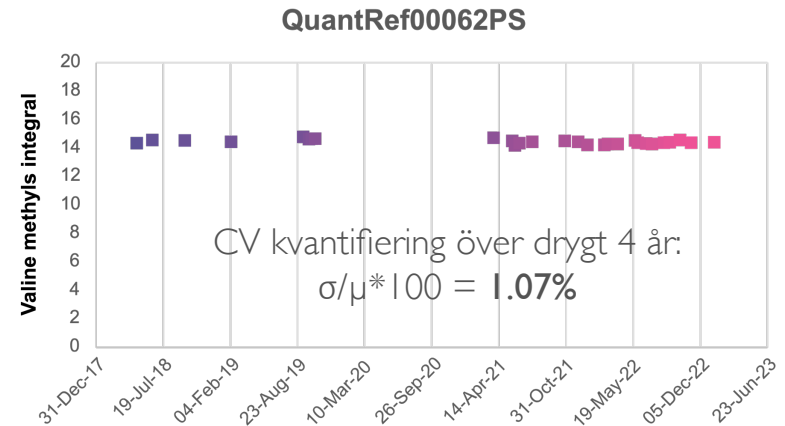
från Wang et al. *J Pharm Sci* 2020(109): 1519-1528





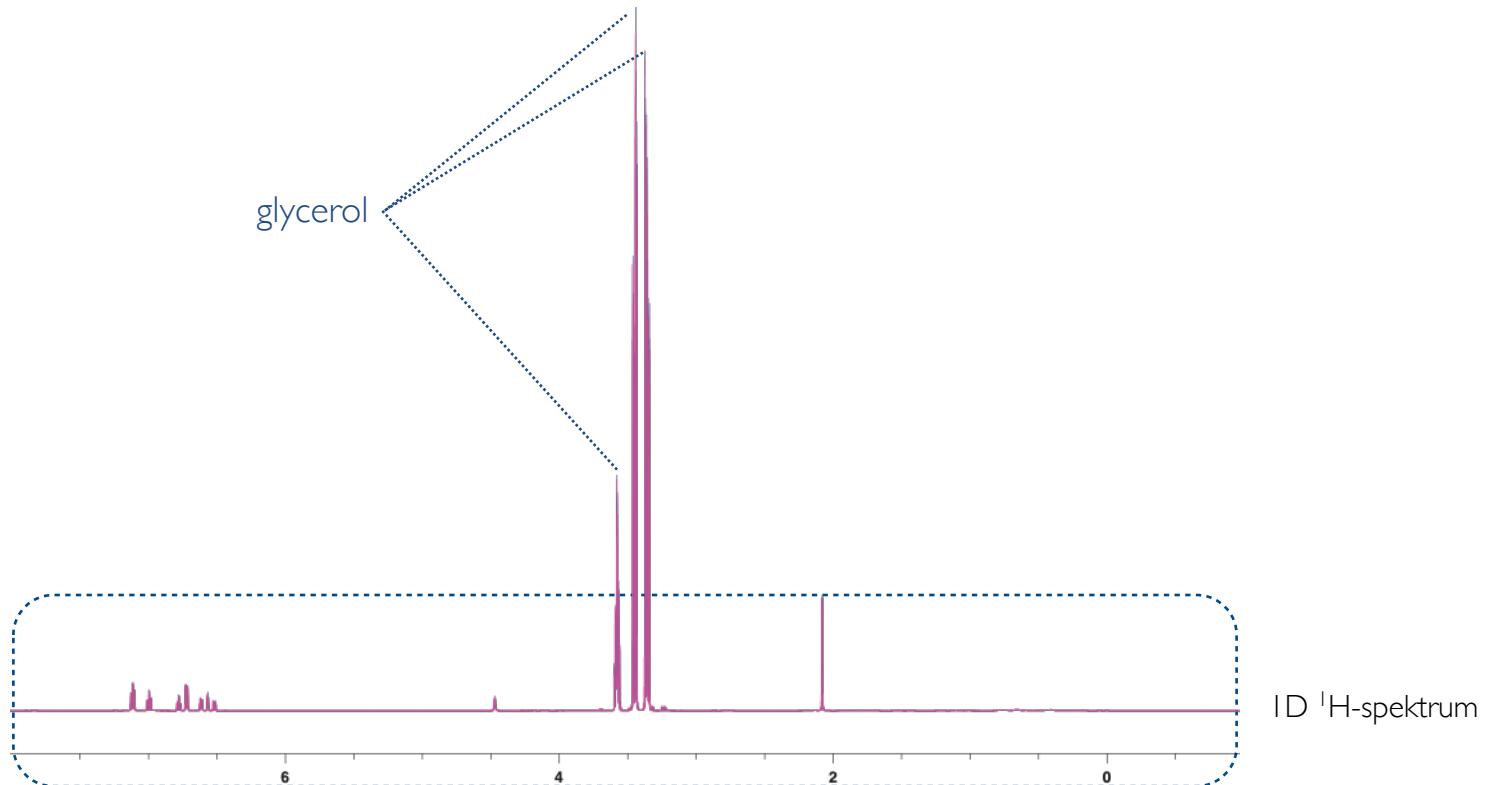
# Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik

- ▶ ID  $^1\text{H}$  NMR som en QC-teknik för insulin?
  - kvantitativt, en signals integral  $\propto$  koncentration
  - kvantifiera både högmolekylära (insulin) och lågmolekylära (excipienter) komponenter
  - minimal provberedning
  - fenomenalt reproducerbart
- ▶ Mäta på prov som är väldigt nära farmaceutiska formuleringen
  - utspädning med 10%  $\text{D}_2\text{O}$  är enda beredningssteget
  - samla in data under strikt SOP
    - (temp, vattenundertryckning, kvantifieringsreferens)



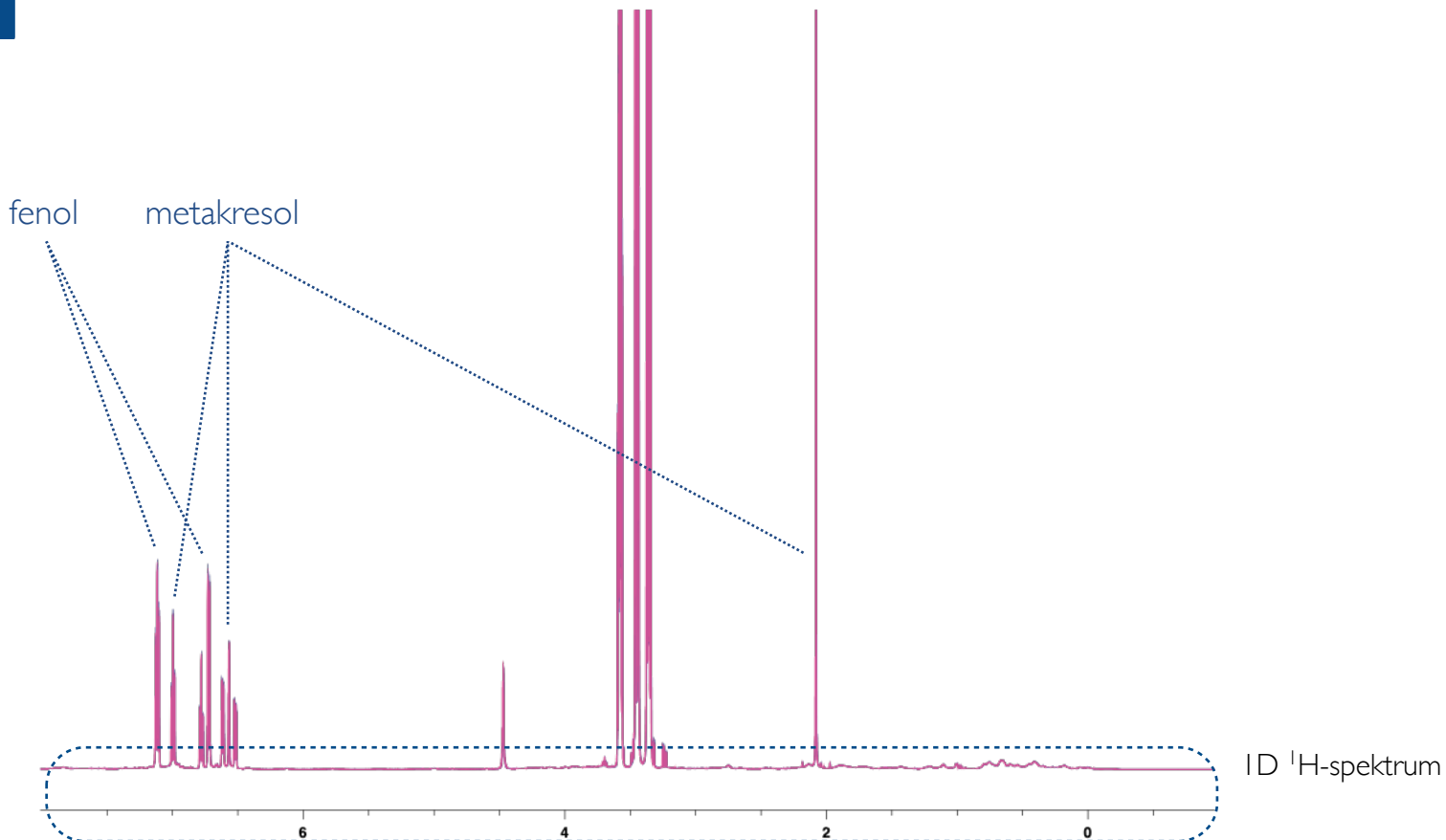


# Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik



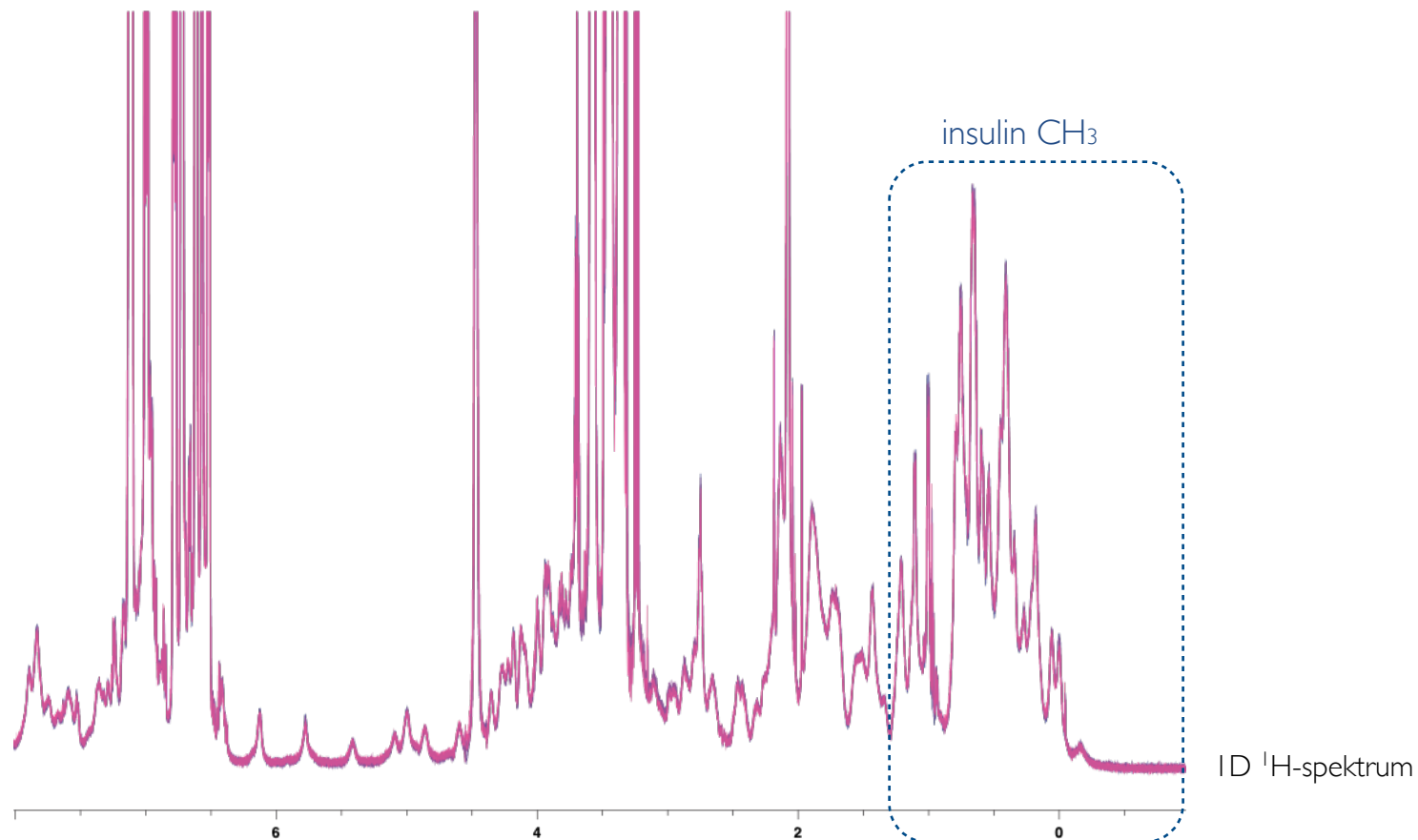


# Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik





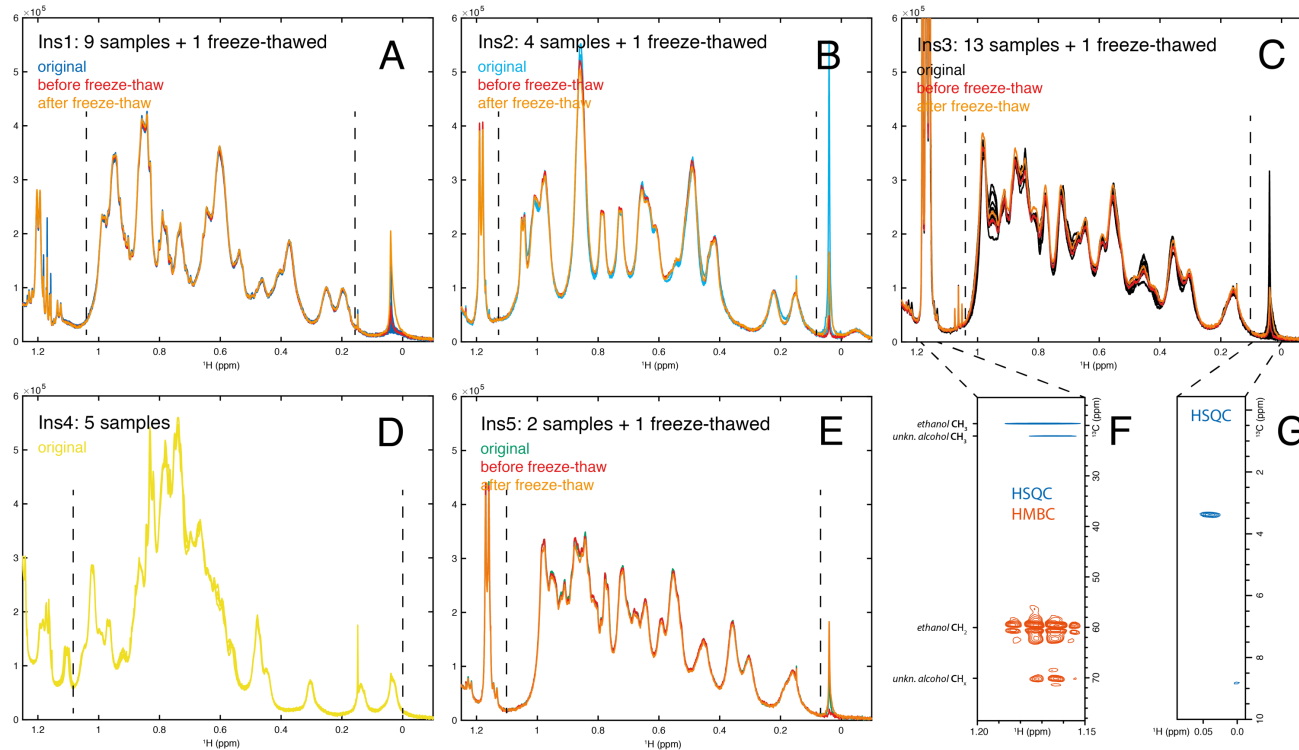
# Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik





# Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik

## Kvantifiering av insulin



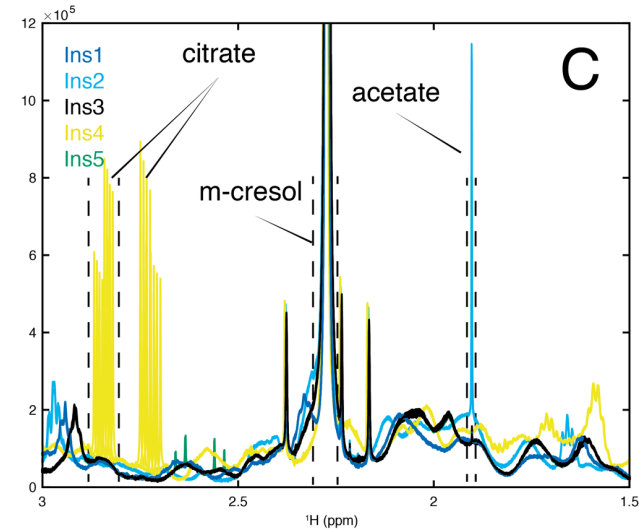
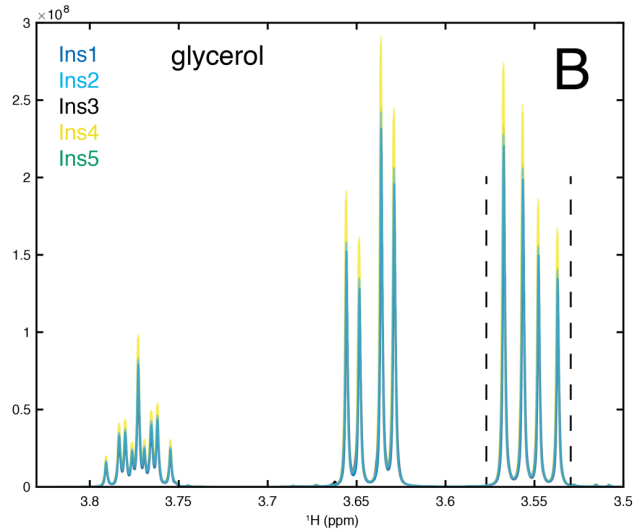
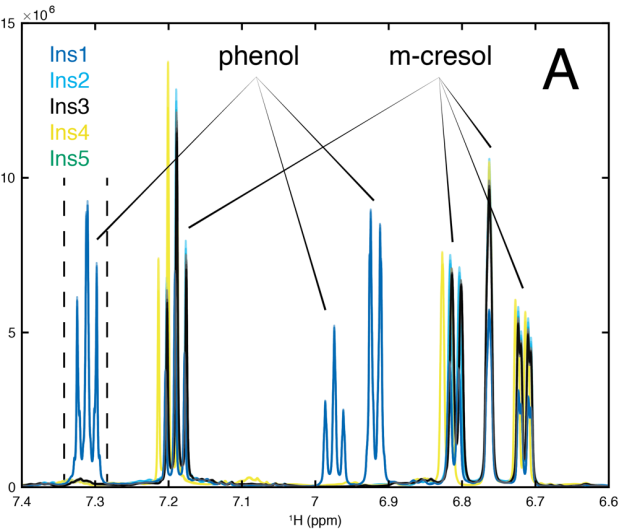
- A Ins1: Novorapid
- B Ins2: Actrapid
- C Ins3: Humalog
- D Ins4: Lantus
- E Ins5: Lispro

Malmodin *et al.* (2020) *J Diabetes Sci Technol*



# Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik

## Kvantifiering av excipienter



Ins1: Novorapid  
Ins2: Actrapid  
Ins3: Humalog  
Ins4: Lantus  
Ins5: Lispro



## Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik

**Table 1.** Sample Overview With Insulin and Excipient Concentrations.

Sample/type	Expiry date (no of samples)	n	Freeze-thaw	[Insulin] mM $\pm$ SD (mg/ml $\pm$ SD)	% of 3.5 mg/ml Insulin	[Glycerol] mM $\pm$ SD	[m-Cresol] mM $\pm$ SD	Other excipients concentration $\pm$ SD
Ins1/Rapid-acting analog	02/2019 (3); 07/2019 (3); 10/2019 (1); 01/2020 (2)	9	No	0.593 $\pm$ 0.0022 (3.44 $\pm$ 0.013)	98	215 $\pm$ 0.53	17.5 $\pm$ 0.13	Phenol 15.6 $\pm$ 0.065 mM
	01/2020	1	Yes	0.596 (3.45)	99	215	17.6	Phenol 15.6 mM
Ins2/Short-acting	10/2018 (2); 12/2018 (2)	4	No	0.604 $\pm$ 0.019 (3.50 $\pm$ 0.11)	100	223 $\pm$ 3.2	31.1 $\pm$ 0.46	Acetate 154 $\pm$ 7.0 $\mu$ M
	10/2018	1	Yes	0.577 (3.34)	96	224	31.1	Acetate 161 $\mu$ M
Ins3/Rapid-acting analog	10/2019 <sup>a</sup> (4); 10/2019 <sup>a</sup> (5); 11/2019 (1); 01/2020 (1); 02/2020 (1); 03/2020 (1)	13	No	0.623 $\pm$ 0.014 (3.61 $\pm$ 0.083)	103	217 $\pm$ 1.1	31.2 $\pm$ 0.091	Ethanol <sup>b</sup> 5.29 $\pm$ 0.14 mM
	10/2019	1	Yes	0.648 (3.76)	107	217	31.2	Ethanol <sup>b</sup> 5.41 mM
	04/2018 (1); 04/2019 (1); 05/2019 (1); 10/2019 (1); 03/2020 (1)	5	No	0.646 $\pm$ 0.0097 (3.74 $\pm$ 0.056)	107	253 $\pm$ 3.3	28.3 $\pm$ 0.31	Citrate 459 $\pm$ 46 $\mu$ M
	01/2020 (2)	2	No	0.608 $\pm$ 0.010 (3.53 $\pm$ 0.059)	101	218 $\pm$ 2.1	31.8 $\pm$ 0.42	Citrate 48.2 $\pm$ 7.4 $\mu$ M
	01/2020	1	Yes	0.597 (3.46)	99	218	32.2	Citrate 56.4 $\mu$ M

<sup>a</sup>Two different batches. <sup>b</sup>Major fraction of methyl triplet (see Figure 1F).

Ins1: Novorapid  
Ins2: Actrapid  
Ins3: Humalog  
Ins4: Lantus  
Ins5: Lispro





# Projekt I: insulin och NMR som QC-teknik

## Slutsatser

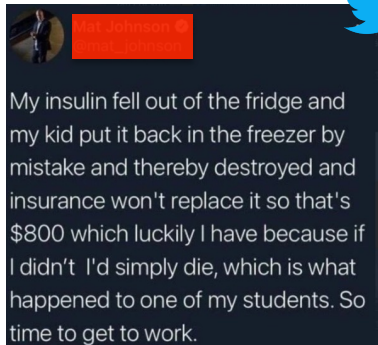
- ▶ Inga problem med insulinkoncentration i de undersökta ampullerna från **SE** apotek/kliniker
- ▶ ID  $^1\text{H}$  NMR är ett bra alternativ för kvalitetskontroll av insulin **och** excipienter
- ▶ Den etablerade FDA-godkända USP/EP metodiken är LC-UV på surgjort insulin
  - koncentrationen av insulinmonomeren är det enda som mäts
  - mäts på prov långt ifrån den farmaceutiska formuleringen = inget molekylärt 'fingeravtryck' eller bedömning av tertiär/kvartenärstruktur
  - finns inget egentligt incitament för industrin att ändra metodik



## Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet

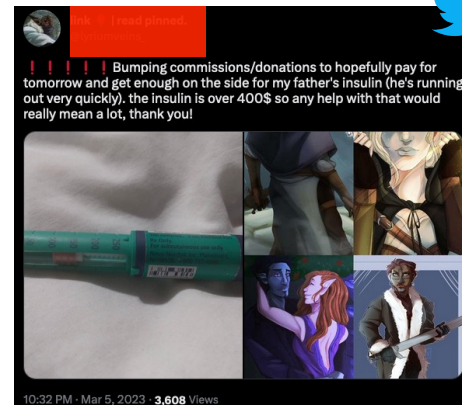
### Premiss

- Nuvarande rekommendationer för insulinhantering och förvaring är slösaktiga (kyltemperatur, frånvaro av direkt belysning)
  - bruten kylkedja under transport till apotek/alutanvändare → **kassera**
  - öppnad insulinampull efter utgångsdatum → **kassera**
  - insulin exponerat för frystemperatur → **kassera**
  - insulin förvarad vid rumstemperatur mer än en månad → **kassera**
- Hur ligger det till i mindre privilegierade delar av världen?



### Over 1 million Americans with diabetes rationed insulin in past year

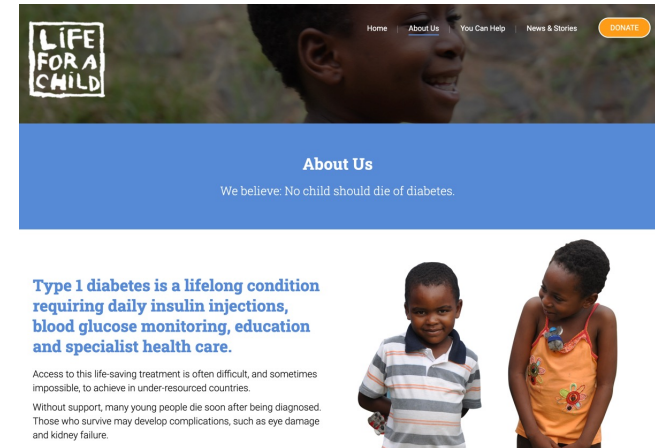
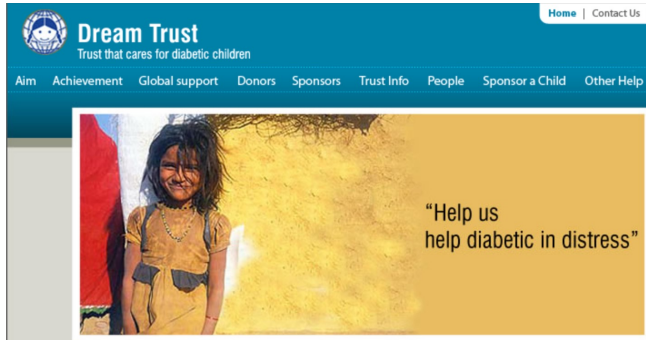
By Linda Searling  
November 9, 2022 at 10:01 a.m. EDT





## Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet

- Projekt koordinerat från Sydney/Brisbane av Dr. Graham Ogle (Life for a child)
- Förvaring av öppnade insulinampuller (6 typer) i 4 månader, provtagning vid 1, 2 och 4 månader
- Kontrollprover i en kyl på DREAM Trust i Nagpur
- Sex familjer rekryterades att förvara insulinampuller antingen i en öppen låda eller en lerkruka i det kallaste rummet i bostaden
- Analysera proverna med USP standardmetodiken vid University of Florida och med NMR vid GU





## Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet

### Handgjorda lerkrukor

- Avdunstning av vatten koler insidan av krukans
- Regelbunden vattentillsats och rengöring av salt nödvändigt, krukans byts ut årligen
- Sänker temperaturen på insidan med ett par grader
- 3\$/kruka

insulinförvaring



vattenutrymmen

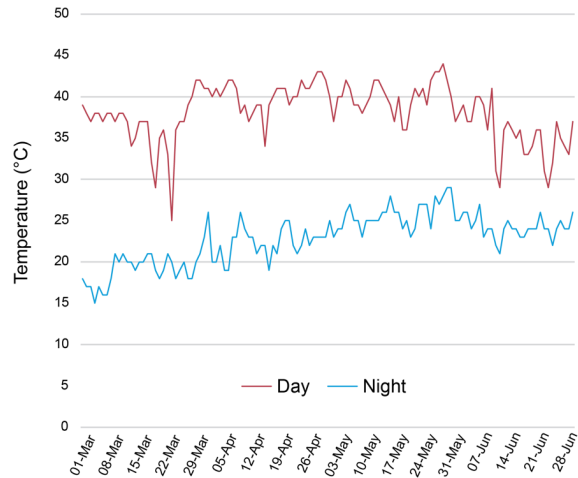
Pendsey *Diabetes Voice* 2006(51): 19



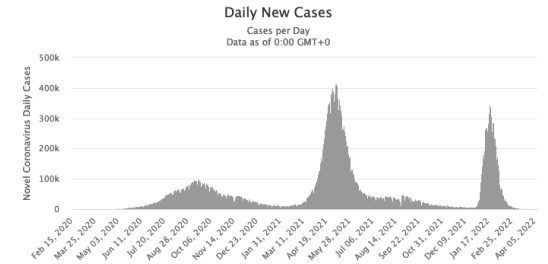
# Projekt 2: verklighetsstudie av insulin stabilitet

Fältstudien utfördes mellan mars och juni 2021, vilket sammanföll med andra covid-19-vågen i Indien

Temperatures Nagpur March–June 2021



Daily New Cases in India

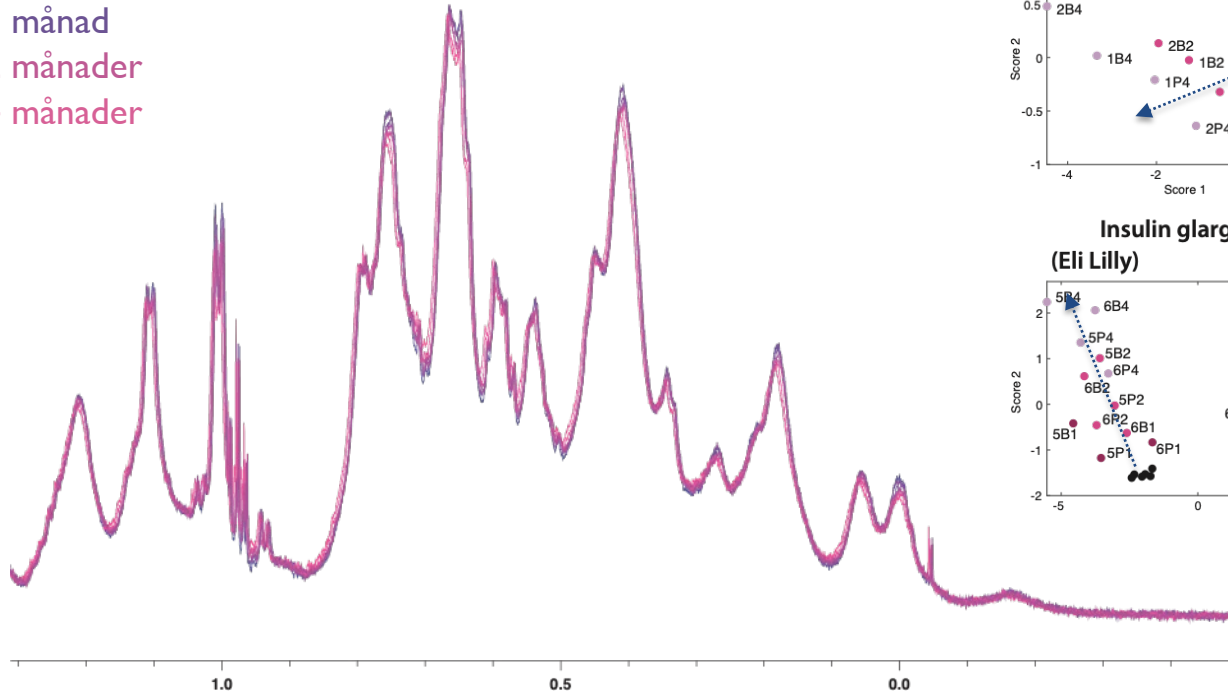


Pendsey et al. (2023) *Lancet Diabetes Endocrinol*

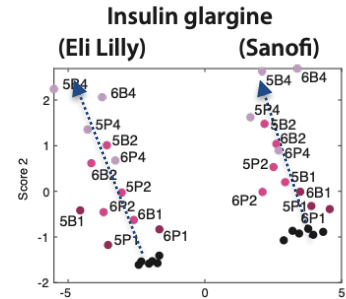
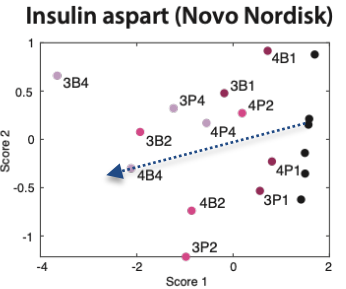
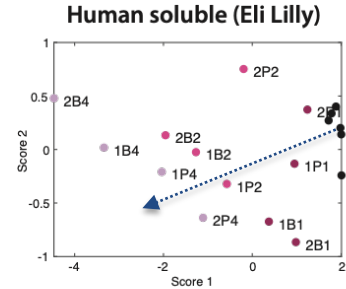


# Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet

kyl  
1 månad  
2 månader  
4 månader



PCA



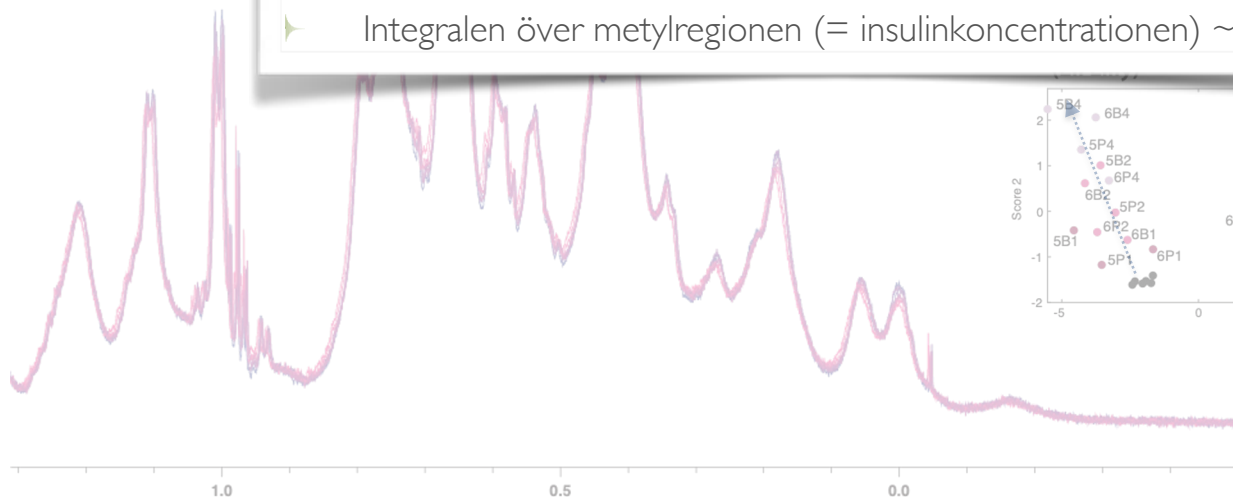
● ctrl  
● 1m  
● 2m  
● 4m

# B/P #  
family storage (box/clay pot) time



# Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet

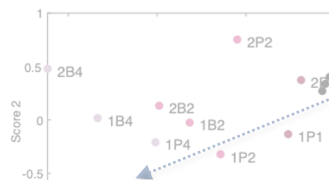
kyl  
1 månad  
2 månader  
4 månader



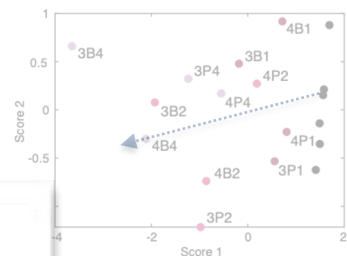
Små förändringar i linjebredd och/eller toppskift  
Integralen över metylregionen (= insulinkoncentrationen) ~oförändrad

## PCA

Human soluble (Eli Lilly)



Insulin aspart (Novo Nordisk)

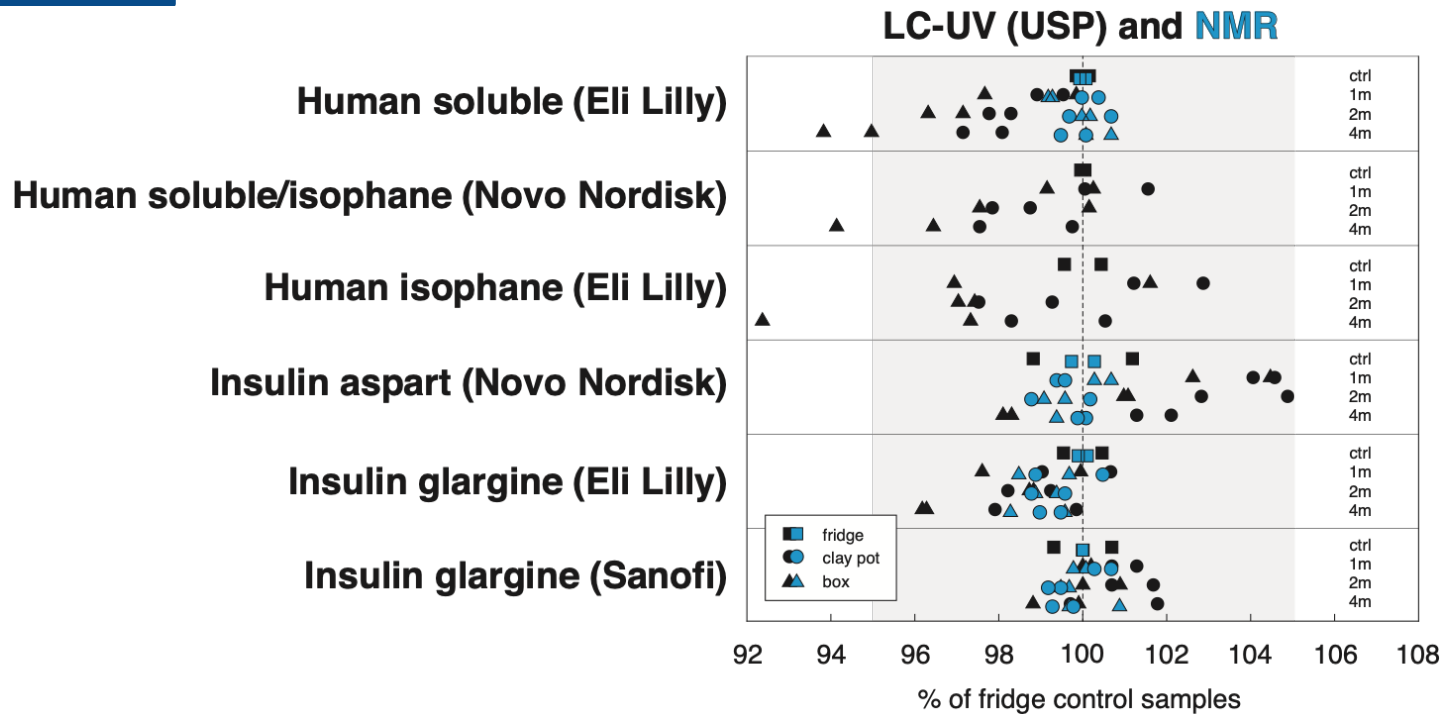


● ctrl  
● 1m  
● 2m  
● 4m

# B/P #  
family storage (box/clay pot)      time



## Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet





## Projekt 2: verklighetsstudie av insulin stabilitet

### Slutsatser

- ▶ Temperaturen  $2.6 \pm 1.8$  °C lägre i lerkruka än i en öppen låda
- ▶ Insulink**oncentrationen** stabil över tid
- ▶ Med få undantag (enl. LC-UV-metoden) är alla insulinampuller inom det tillåtna intervallet
- ▶ Lerkruka bättre än öppen låda – mindre effekt på linjebredd/toppskift i NMR
- ▶ (Precisionen av LC-UV-metoden är **inte** bra, flera %)



## Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet

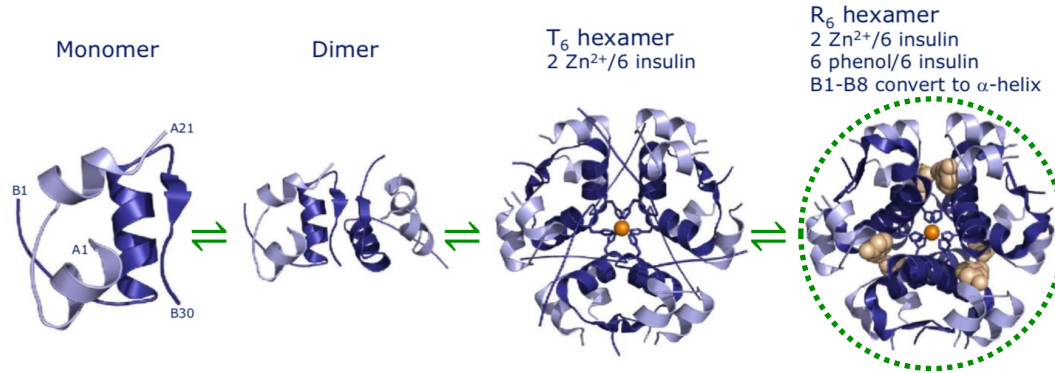
### Svagheter i studien

- ▶ Skvalt statistiskt underlag för att motivera ändring av rekommendationer – större studie krävs
- ▶ Ingen bedömning av insulinets förmåga att aktivera insulinreceptorn
- ▶ Ingen simulering av 'riktig' användning, ex. med regelbundet genomborrande av ampullseptum
- ▶ Ingen förklaring till de förändringar som syns i NMR-spektra

...ny större studie i planeringsstadiet..



## Projekt 2: verklighetsstudie av insulinstabilitet



Vad händer då egentligen i stängda ampuller med tiden? Hypotes: jämviktsförskjutning

- ▶ Undersök existerande (gamla) Indienampuller med biofysikaliska tekniker och jämför med fräscha ampuller
  - SEC-MALS: bedöm kvartenärstruktur med gelfiltrering kopplad till ljusspridningsanalys
  - ThioflavinT assay: finns det fibriller i Indienampullerna?
  - DSF assay: syns förändringen i förvaringstid som ett skift av smältpunkten för insulin?
  - Nativgelselektrofores: bedöm andelen dimer/monomer och hexamer



UNIVERSITY OF  
GOTHENBURG

Tack för uppmärksamheten!

*Svenskt NMR-centrum vid GU*

B. Göran Karlsson

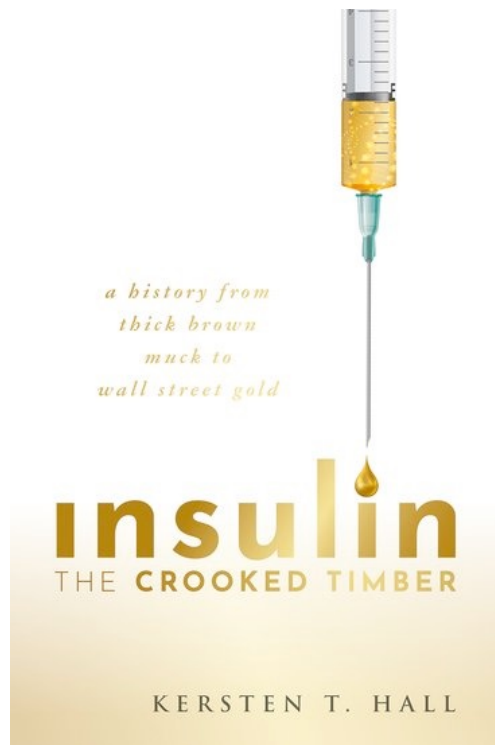
Daniel Malmödin

Anders Bay Nord

Ashish Kawale

*Drottning Silvias Barnsjukhus*

Gun Forsander



*DREAM Trust, Nagpur*

Sanket Pendsey

Sharad Pendsey

*Life for a Child, Sydney*

Graham D. Ogle

Jayanthi Maniam

*Univ. of the Sunshine Coast, Petrie*

Steven James

*Univ. of Florida, Gainesville*

Mark A. Atkinson

Timothy J. Garrett