

Aus den Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Klinik für Stoffwechselkrankheiten und Ernährung

(WHO Collaborating Center for Diabetes)

Direktor: Prof. Dr. M. Berger

**Wirkprofile von
Mischinsulinformulierungen
bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Lothar Bleckmann

2003

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Heinemann

Koreferent: Prof. Dr. Koschinsky

Danksagung

Ich möchte mich bei all den Menschen für die Unterstützung fachlicher und menschlicher Art bedanken, die mir während der experimentellen Phase, sowie der anschließenden Ausarbeitung der nun endlich vorliegenden Arbeit, zuteil wurde. Insbesondere möchte ich dabei Herrn PD. Dr. Lutz Heinemann hervorheben, der mir während der Betreuung zu jeder Zeit bei fachlichen und Problemen der Motivation hilfreich war. Mein Dank gilt ebenso der Firma Eli Lilly & Co. und deren Unterstützung bei dieser Studie.

Besonderen Dank an dieser Stelle auch an meine Eltern die mir eine Ausbildung in dieser Form ermöglichten und an meine Frau Cornelia, auf deren aller Unterstützung ich jederzeit bauen konnte und kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Methodik	4
2.1	Patienten	4
2.2	Studienmedikation	4
2.3	Studiendurchführung	5
2.4	Teilnahmebedingungen	6
2.4.1	Teilnahmekriterien	7
2.4.2	Ausschlußkriterien	7
2.5	Glukose-Clamp-Technik	8
2.6	Versuchsordnung	9
2.6.1	Versuchsablauf	9
2.6.2	Versuchsdurchführung	10
2.6.3	Blutentnahmen	13
2.7	Protokollverstöße	14
2.8	Unerwünschte Vorkommnisse	14
2.9	Analytische Methoden	15
2.9.1	Glukose	15
2.9.2	Insulin	16
2.9.2.1	Freies Insulin	16
2.9.2.2	Freies Insulin Lispro	16
2.9.3	Insulinantikörper	17
2.10	Pharmakodynamische Methoden	17
2.10.1	Blutglukose	17
2.10.2	Glukoseinfusionsraten	18
2.10.3	Gesamtmenge an infundierter Glukose	18
2.10.4	Freies Insulin	18
2.10.5	Freies Insulin Lispro	19
2.10.6	Vorzeitig beendete Versuche	19
2.11	Pharmakokinetische Methoden	19
2.12	Statistische Auswertung	20
3	Ergebnisse	22
3.1	Blutglukosekonzentration	22
3.2	Glukoseinfusionsraten	26

3.3	Vergleich der vier Insulinformulierungen	30
3.4	NPL-Insulin versus NPH-Insulin	35
3.5	Abhängigkeit der glukodynamischen Effekte vom Geschlecht	36
3.6	FIRI- und FIL-Konzentrationen	36
3.7	Insulinantikörper	43
4	Vergleich mit gesunden Probanden	46
4.1	Pharmakodynamik	46
4.2	Pharmakokinetik	52
4.3	Korrelation der Ergebnisse beider Studien	56
5	Diskussion	60
5.1	Studiendesign	60
5.2	Ergebnisse	61
5.2.1	Pharmakodynamik	61
5.2.1.1	Blutglukosekonzentration	61
5.2.1.2	Glukoseinfusionsraten	63
5.2.2	Pharmakokinetik	65
5.2.2.1	Bestimmung der FIRI- und FIL-Konzentration	65
5.2.2.2	Vergleich der Insulinkonzentrationen	66
5.2.3	Insulinantikörper	67
5.3	Vergleich von Patienten mit Diabetes mellitus und gesunden Probanden	68
6	Zusammenfassung	71
7	Anhang	73
7.1	Abkürungsverzeichnis	73
7.2	Literaturverzeichnis	75

1 Einleitung

Grundlage der Insulintherapie bei Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus ist der Versuch, die physiologischen Verhältnisse durch exogene Zufuhr von Insulin zu imitieren. Die moderne, intensivierete Insulintherapie versucht den physiologischen Verlauf der im Blut zirkulierenden Insulinkonzentration möglichst identisch nachzuahmen. Mit der Gabe eines Verzögerungsinsulins wird der basale Bedarf und durch die variable Applikation von kurzwirkendem Insulin zu den Mahlzeiten die prandial notwendige Menge an Insulin substituiert [1, 2, 3, 4]. Die Therapieziele Normoglykämie sowie bestmögliche Lebensqualität und eine möglichst niedrige Rate an Akut- und Spätkomplikationen können mit diesem Therapiekonzept erreicht werden [5]. Das Verhältnis von kurzwirkendem und Verzögerungsinsulin kann entsprechend dem Zeitpunkt der Applikation, der geplanten Kalorienaufnahme, der physischen Aktivität und anderen den Patienten individuell betreffenden Faktoren variiert werden. Um die Anzahl der notwendigen Insulininjektionen so gering wie möglich zu halten, werden die beiden unterschiedlichen Insulintypen (kurzwirkendes Insulin und Verzögerungsinsulin) auch als bereits fertiges Gemisch kommerziell angeboten. Vorgefertigte Mischinsulinpräparate sind in der Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus (IDDM) die am häufigsten verwendeten Insulinformulierungen. Sie gewährleisten mit den kurzwirkenden Insulinanteilen des Mischinsulins eine gute postprandiale Kontrolle der Blutglukosekonzentration und mit den Anteilen des Verzögerungsinsulins eine ausreichende basale Insulinsubstitution.

Insulin besteht aus einer 21 Aminosäuren langen A-Kette und einer 30 Aminosäuren langen B-Kette. Beide Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Insulin-Monomere assoziieren abhängig vom pH-Wert, Ionisierungsgrad und der Proteinkonzentration zu Dimeren und Hexameren [6]. An dieser selbständig ablaufenden Reaktion ist die Aminosäure Prolin an Position 28 am C-terminalen Ende der B-Kette beteiligt [7]. Entfernt oder ersetzt man das Prolin an dieser Stelle, so ist die Selbstassoziationstendenz der Insulinmoleküle stark reduziert. Bei Insulin Lispro (Lys [B28], Pro [29]), einem rasch wirkendem Insulinanalogon, ist Prolin an Position 28 der B-Kette mit Lysin an Position 29 vertauscht. Dieser Austausch der Aminosäuren reduziert das Auftreten von Dimeren und Hexameren bei Insulin Lispro-Molekülen um den Faktor 300 [8]. Insulin Lispro (Humalog^R) assoziiert

trotzdem zu Hexameren, die allerdings nach der s.c. Injektion rasch zu Insulinmonomeren zerfallen, was eine schnellere Absorption aus dem Gewebe zur Folge hat [9]. Im Vergleich mit kurzwirkendem Humaninsulin führt die subkutane Injektion von Insulin Lispro zu einem veränderten Zeit-Wirk-Profil, mit einem schnelleren Wirkungsbeginn und einer kürzeren Wirkdauer [10, 11, 12]. In der praktischen Therapie hebt dies die Notwendigkeit des Spritz-Eß-Abstandes auf. Diese positiven Eigenschaften von Insulin Lispro, kombiniert mit denen eines Verzögerungsinsulins, ermöglichen es, den Patienten weiter verbesserte Therapiemöglichkeiten anzubieten.

Neutrales Protamin Hagedorn-Insulin (NPH-Insulin) ist ein Verzögerungsinsulin, das mit kurzwirkenden Insulinformulierungen vermischt werden kann, ohne daß sich die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften eines der beiden Mischungspartner ändert [1]. Bei der Mischung von Insulin Lispro mit NPH-Insulin kommt es allerdings bei entsprechend langer Lagerungszeit zu einem partiellen Austausch des in Lösung befindlichen kurzwirkenden Insulinanalogons und des Protamin-gebundenen Humaninsulins [13]. Um dies zu verhindern, wurde eine Protamin-gebundene Formulierung mit Insulin Lispro entwickelt (Neutral Protamin Lispro [NPL-Insulin]), welche ähnliche Eigenschaften wie NPH-Insulin aufweist [14]. Die Verwendung von NPL-Insulin für Mischinsuline aus Insulin Lispro und NPL-Insulin ermöglicht über Jahre hinweg die problemlose Lagerung eines solchen Gemisches [15].

Zwei nur in ihrem Mischungsverhältnis von Insulin Lispro zu NPL-Insulin differierende Formulierungen wurden entwickelt: Low Mixture (LM) mit einem Verhältnis von 25% Insulin Lispro zu 75% NPL-Insulin und Mid Mixture (MM) mit einem Verhältnis von 50% Insulin Lispro zu 50% NPL-Insulin. Eine mit diesen Mischinsulinen und gesunden Probanden durchgeführte frühere Studie (Heise [1998]) hat gezeigt, daß jede dieser Formulierungen charakteristische und sich unterscheidende pharmakokinetische und glukodynamische Profile aufweist [16]. Obwohl deutliche Unterschiede in der Pharmakokinetik und der Glukodynamik zwischen den beiden Insulinmischungen bei gesunden Probanden gezeigt wurden, wurde dies noch nicht in einer Studie mit Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 nachgewiesen.

Ziel dieser klinisch-experimentellen Studie war es, die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der vier Insulinformulierungen LM, MM, NPL- und NPH-Insulin bei Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus zu untersuchen.

2 Methodik

2.1 Patienten

13 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1, elf Männer und zwei Frauen, wurden für diese Studie rekrutiert. Ein Patient war afrikanischer Abstammung (Nr. 9, OOS), der Rest Kaukasier. Eine Übersicht der Patientendaten gibt Tabelle 1.

Tabelle 1 Patientendaten

Patient Nr.	Initialen	Alter (Jahre)	Sex	Diabetesdauer (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m ²)
1	SLE	23	m	17	192	88,0	23,9
2	OOS	29	m	7	185	79,0	23,1
3	HDI	37	m	19	192	93,0	25,2
4	JFI	38	m	17	191	91,0	24,9
5	KKR	-	m	-	-	-	-
6	JKA	36	m	15	183	83,0	24,8
7	FKL	32	m	16	170	65,0	22,5
8	SKL	31	w	12	163	60,0	22,6
9	OOS	32	m	13	192	96,0	26,0
10	RSO	43	w	23	163	74,0	27,9
11	UFR	28	m	16	174	74,9	25,4
12	GGR	32	m	13	187	81,7	23,4
13	UPF	29	m	17	179	72,0	22,5
	Median	32,6		15,4	181	80,0	24,3
	SD	5,2		3,8	11	11,1	1,7
	Min.	23		7	163	60,0	22,5
	Max.	43		23	192	96,0	27,9

Alle zwölf Patienten, die für diese Studie ausgewählt wurden, beendeten sie auch. Patient Nr. 5 (KKR) wurde für den Fall des vorzeitigen Ausscheidens eines anderen Studienteilnehmers als Ersatzperson gescreent. Er erhielt keinerlei Studienmedikamente und wurde in die Auswertung nicht mit einbezogen.

2.2 Studienmedikation

Es wurden 4 verschiedene Insulinformulierungen als Studienmedikation verwendet: LM, MM, NPL- und NPH-Insulin. Sie alle wurden von der Firma Eli Lilly & Co., Indianapolis, USA hergestellt. Die Patienten erhielten nur 3 der 4 möglichen Insulin-

präparate, d.h. eine Insulinformulierung wurde jeweils 9 Patienten randomisiert zugeteilt.

Tabelle 2 Verteilung der Insulinformulierungen auf die Studienteilnehmer

Insulinformulierung	Patienten												
	-	2	3	4	-	-	7	8	-	10	11	12	13
LM	-	2	3	4	-	-	7	8	-	10	11	12	13
MM	1	-	3	4	-	6	7	8	9	10	-	12	-
NPL-Insulin	1	2	-	4	-	6	7	-	9	-	11	12	13
NPH-Insulin	1	2	3	-	-	6	-	8	9	10	11	-	13

Die Patienten sind entsprechend der Numerierung von Tabelle 1 wiedergegeben.

Die zu applizierende Dosis von 0,3 U/kg wurde auf die nächst größere ganze Insulin-einheit aufgerundet. Den Patienten wurde die Insulindosis des für den jeweiligen Versuchstag vorgesehenen Insulins mit einer Spritze subkutan in eine abgehobene Hautfalte des linken Unterbauches injiziert. Zusätzlich wurde Normalinsulin (Humulin^R) während jedes Glukose-Clamp-Versuches in der Vorlaufphase als basale, intravenöse Insulininfusion bzw. als i.v.-Insulinboli verwendet. Alle Insulinpräparate wurden bis zum Gebrauch in einem Kühlschrank bei ca. 6°C aufbewahrt.

Tabelle 3 Verwendete Insulinformulierungen

Name	Ratio Lispro: NPL	Chargen-Nr.	Konzentration (U/ml)
NPH-Insulin	-	FF6A02H	100
Mid Mixture (MM)	50:50	CT08749	100
Low Mixture (LM)	25:75	CT08748	100
NPL-Insulin	0:100	CT08750	100
Humulin ^R	-	FF6AK5C	100

Im Zeitraum zwischen den einzelnen Versuchstagen benutzten die Patienten ihre üblichen Insulinpräparate, die sie bereits vor Studienbeginn verwendet hatten.

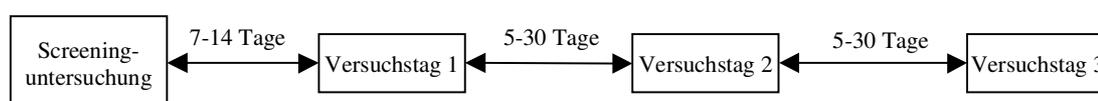
2.3 Studiendurchführung

Die Durchführung der Studie erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Es wurde entsprechend den Prinzipien der revidierten Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki, gemäß den Vorschriften des Arzneimittelausschusses der Europäischen

Gemeinschaft zur “Good-Clinical-Practice“ (GCP), des geltenden Bundes- und Landesrechts, sowie der ärztlichen Berufsordnung verfahren.

An dieser offenen, randomisierten, monozentrischen Cross-Over-Studie nahmen 12 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 teil, die festgelegte Voraussetzungen erfüllen mußten (s. 2.4). Die Studie wurde im Zeitraum von Ende Juli bis Mitte September 1997 durchgeführt. Insgesamt umfaßte die Studie für alle teilnehmenden Patienten 4 Visiten.

Abbildung 1 Struktureller zeitlicher Studienablauf



Die erste Visite diente dem Screening, während die Visiten 2, 3 und 4 als eigentliche Versuchstage vorgesehen waren. Zwischen Visite 1 und 2 sollten mindestens 7 und höchstens 14 Tage liegen, während zwischen den einzelnen Versuchstagen ein Minimum von 5 und ein Maximum von 30 Tagen nicht überschritten werden sollte. Bei Visite 1 wurde von den Patienten eine ausführliche Anamnese erhoben, eine klinisch körperliche Untersuchung durchgeführt, ein EKG geschrieben und eine Blut- und Urinprobe abgenommen. Die Blutprobe diente der Bestimmungen eines kleinen Blutbildes, einiger laborchemischer Parameter, Serum-C-Peptid und von kreuzreaktiven, Humaninsulin-spezifischen und Insulin Lispro-spezifischen Antikörpern, die Urinprobe einer Urinanalyse. Die aus den Proben ermittelten Blut- und Urinwerte mußten innerhalb vorgegebener Grenzwerte liegen (s. 2.4).

Weiterhin wurden die Patienten über die Bedingungen zur Studienteilnahme und den Ablauf der Studie aufgeklärt und eventuell vorhandene Fragen beantwortet. Bei den partizipierenden Frauen wurde jeweils ein Schwangerschaftstest am Anfang und am Ende der Studie durchgeführt. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

2.4 Teilnahmebedingungen

Die Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, mußten folgende Bedingungen erfüllen.

2.4.1 Teilnahmekriterien

1. Alter zwischen 18 und 50 Jahre
2. Nüchtern-Serum-C-Peptidkonzentration $<0,3$ ng/ml
3. Durchführung einer intensiven Insulintherapie mit mehrfacher täglicher Injektion von kurzwirkendem Insulin und Verzögerungsinsulin oder Verwendung einer Insulinpumpe
4. Selbständige und regelmäßige Blutglukosebestimmung seit mindestens 60 Tagen vor Studienbeginn mittels eines Blutzuckermeßgerätes
5. HämoglobinA_{1c}-Wert $<150\%$ des Normwertes, der innerhalb der letzten 60 Tage vor Studienbeginn oder bei Visite 1 gemessen wurde
6. Negativer Schwangerschaftstest bei den weiblichen Studienteilnehmern
7. Vorliegende schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie

2.4.2 Ausschlußkriterien

1. Body Mass Index >28 kg/m²
2. Serumkreatinin >2 mg/dl
3. Teilnahme an anderen medizinischen, chirurgischen oder pharmazeutischen Studien innerhalb der letzten 6 Monaten oder einer Insulin Lispro-Studie, die 30 Tage vor Beginn dieser Studie endete
4. Einnahme von oralen Antidiabetika wie Biguanide, Sulfonylharnstoffe oder Glukosidaseinhibitoren 30 Tage vor Studienbeginn
5. Bekannte Allergien gegen Insulin, Trägersubstanzen in Insulin oder gegen Protamin
6. Täglich benötigte Insulinmenge $>2,0$ U/kg/Tag
7. Einnahme von systemischen Glukokortikoiden innerhalb des letzten Monats vor Studienbeginn
8. Verwendung von Ultralente
9. Bekannter Alkohol- bzw. Drogenabusus
10. Bekannte transiente ischämische Attacken, cerebrovaskuläre oder periphere Durchblutungsstörungen
11. Bestehende Dialysepflicht
12. Zustand nach Nierentransplantation
13. Bekannte Nebenniereninsuffizienz
14. Bekannte gastrointestinale Erkrankungen

15. Klinische Symptome einer Lebererkrankung, einer akuten oder chronischen Hepatitis oder doppelt so hohe Werte der Transaminasen wie die Normwerte des untersuchenden Labors
16. Schlecht eingestellter Hypertonus
17. Bekannte Hämoglobinopathie oder chronische Anämie
18. Bekannte chronische Infektionen
19. Krankenhausaufenthalt innerhalb der letzten 12 Wochen aufgrund einer akuten oder chronischen Erkrankung
20. Vollblutspende 8 Wochen vor Studienbeginn
21. Schwangere Frauen oder Frauen, die beabsichtigen, während der Studie schwanger zu werden
22. Sexuell aktive Frauen, die weder hormonelle Kontrazeption noch einen Intrauterinpessar oder eine andere Form der sicheren Verhütung betreiben
23. Stillende Frauen
24. Weitere Kriterien, die aus den vorangehend aufgeführten oder anderweitigen Gründen den Ausschluß von der Studie erfordern

Bei allen an der Studie teilnehmenden Patienten trafen die oben angeführten Ausschlußkriterien nicht zu.

2.5 Glukose-Clamp-Technik

Glukose-Clamp-Versuche stellen den Goldstandard zur Untersuchung pharmakodynamischer und pharmakokinetischer Eigenschaften von Insulinformulierungen und Insulinapplikationstechniken dar. Bei der Versuchsanordnung, wie sie bei dieser Studie verwendet wurde, hält eine variable, intravenös infundierte Glukoseinfusion bei dem mit dem Biostator konnektierten Patienten die Blutglukosekonzentration bei einem vorab festgelegten Zielwert konstant. Die Menge an infundierter Glukose, die notwendig ist um die Blutglukosekonzentration konstant zu halten, reflektiert die metabolische Wirkung des applizierten Insulins. Mittels dieses Meßverfahrens lassen sich die Wirkprofile von Insulinformulierungen ermitteln. Die pharmakodynamischen Kenngrößen werden aus den ermittelten Wirkprofilen bestimmt [17, 18].

Der Biostator (glucose controlled insulin infusion system, GCIIS, Life Science Instruments, Elkhart, Indianapolis, USA) wurde entwickelt, um die maschinelle,

automatisierte Durchführung des oben angeführten Prinzips zu ermöglichen. Er mißt mit einem Glukose-Sensor kontinuierlich die Blutglukosekonzentration des mit ihm verbundenen Patienten und berechnet mit Hilfe eines speziell hierfür entwickelten Algorithmus die notwendige, intravenös zu infundierende Menge an Glukose, um die Blutglukose möglichst nahe bei dem vorab festgelegten Zielwert konstant zu halten [19]. Dabei bilden der Patient und der Biostator einen geschlossenen Regelkreislauf. Die zu infundierende Glukosemenge (dies entspricht der Glukoseinfusionsrate) errechnet der Biostator aus der aktuell gemessenen Blutglukosekonzentration und dem Ausmaß der Veränderung der Blutglukosekonzentration in den vorherigen Minuten [18]. Die gemessenen Daten (aktuelle Uhrzeit, Mittelwert der Blutglukosekonzentration und die Glukoseinfusionsrate) werden vom Biostator als minütliches Protokoll ausgedruckt und in einem Computer gespeichert.

Glukose-Clamp-Versuche werden häufig mit gesunden Probanden, die ein vorgegebenes „Screeningprofil“ erfüllen müssen, durchgeführt, da so bei klinisch-experimentellen Studien möglichst homogene Personengruppe zustande kommen. Die aufgrund des Alters und des Krankheitsverlaufes bedingte hohe Rate an Komorbidität und Komedikation bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 führte u.a. dazu, daß diese Studie mit Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 durchgeführt wurde, da der sogenannte juvenile Diabetes ein Probandenkollektiv ermöglicht, welches eine deutlich geringere Komorbidität bzw. Komedikation außer der Insulinsubstitution aufweist. Ein erheblicher Vorteil bei diesem Probandenkollektiv ist, daß die Wirkung des jeweiligen applizierten Testinsulins ohne eine Beeinflussung durch endogen produziertes Insulin untersucht werden kann, was bei Versuchen mit gesunden Probanden ein Problem sein kann. Die unter 2.4 aufgeführten Teilnahmebedingungen dienten dazu, ein möglichst homogenes Probandenkollektiv auszuwählen.

2.6 Versuchsanordnung

2.6.1 Versuchsablauf

Die Patienten nahmen am Vorabend des jeweiligen Versuchstages eine normale Mahlzeit zu sich, wobei sie die aufgenommene Kalorienmenge wie gewohnt mittels einer Injektion von kurzwirkendem Insulin abdeckten, jedoch die Injektion von

langwirkendem Insulin für die Nacht ausließen. Ab 22:00 Uhr durften sie nichts mehr essen. In den letzten 12 h vor dem Versuch sollten sie nicht mehr rauchen und keinen Alkohol trinken. Auch sollten sie keine übermäßige körperliche Anstrengung im Sinne von Sport oder ähnlichem in den letzten 24 h ausgeübt haben. Sie führten um 3:00 Uhr eine Blutglukoseselbstmessung durch und spritzten eine entsprechend adjustierte Dosis kurzwirkendes Insulin, um einen eventuell erhöhten Blutglukosespiegel bei Bedarf abzusenken. Patienten, die eine Insulinpumpe benutzten, stellten diese um 6:00 Uhr am Morgen des jeweiligen Versuchstages ab. Dieses Vorgehen führte dazu, daß zu Beginn des Versuches der größte Teil des injizierten Insulins aus den subkutanen Depots absorbiert war [1]. Die Versuchsteilnehmer fanden sich am Clamptag um 8:30 Uhr in dem Versuchsraum in der MNR-Klinik der Heinrich-Heine-Universität ein.

Die Patienten wurden dort mit dem Biostator verbunden (s. 2.6.2) und eine intravenöse basale Insulininfusion (Humaninsulin in 100 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung, versetzt mit 2 ml Blut des Patienten) mittels eines Spritzenperfusors (Perfusor[®] sekura FT; B. Braun, Melsungen) von 0,3 mU/kg•min wurde gestartet. Hierdurch konnte ein stabiler Blutglukosespiegel von 90 mg/dl über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde vor Verabreichung des jeweiligen Testinsulins erreicht werden. Diese Versuchsvorlaufphase erstreckte sich über einen Zeitraum von 3 h.

Anschließend wurde den Patienten die berechnete Dosis des jeweiligen Testinsulins subkutan in den linken Unterbauch gespritzt. Die Patienten blieben für die folgenden 19 h nüchtern im Bett, kontinuierlich während der gesamten Zeit mit dem Biostator verbunden. In dieser Zeit wurden Blutproben zur Konzentrationsbestimmung von Blutglukose, Seruminsulin und verschiedenen insulinspezifischen Antikörpern entnommen. Die Gesamtzeitspanne, in der die Versuchsteilnehmer nüchtern blieben, belief sich auf 32 h. Sie konnten Mineralwasser nach Belieben trinken, durften aber nicht rauchen.

2.6.2 Versuchsdurchführung

Um mit dem Biostator verbunden zu werden, wurden jedem Patienten drei Venenverweilkatheter gelegt. Ein Venenverweilkatheter (Venflon[®] 2, Durchmesser 1,2 mm, Ohmeda, Erlangen), wurde retrograd in eine Vene auf dem linken Handrücken bzw. auf dem Handgelenk gelegt. In diese wurde ein mit dem Biostator verbundener

Doppellumenkatheter (DLC-BIO[®], MTB, Amstetten) eingeführt. Durch einen der beiden Schläuche wurde eine Heparin/Kochsalzlösung (100 IE Heparin/ml einer 0,15%igen NaCl-Lösung) zur Katheterspitze gepumpt. Diese Lösung vermischte sich mit dem Blut vor der Katheterspitze. Über den zweiten Schlauch wurde das so weitgehend ungerinnbar gemachte Heparin-Blutgemisch zum Biostator zurückgepumpt [18]. Dort wurde vom Biostator die Blutglukosekonzentration kontinuierlich bestimmt und die korrespondierende Menge an Glukose (20%ige Glukose-Lösung) intravenös infundiert, um den Blutglukosespiegel bei 90 mg/dl konstant zu halten. Der dafür notwendige Venenverweilkatheter (Venflon[®] 2, Durchmesser 1,2 mm, Ohmeda, Erlangen) wurde den Patienten in eine Vene des rechten Unterarmes gelegt. Über diesen erhielten die Patienten die intravenöse, basale Insulininfusion, sowie eine 0,15 mmol/l NaCl-Lösung und eine eventuell zugeschaltete zusätzliche Glukoseinfusion (Infusomat; B.Braun, Melsungen). Zur Blutprobenentnahme für die Konzentrationsbestimmung von Plasmaglukose, Insulin und Insulinantikörpern wurde den Patienten ein dritter Venenverweilkatheter (Venflon[®] 2, Durchmesser 1,4 mm, Ohmeda, Erlangen) in die Kubitalvene der linken Ellenbeuge gelegt. Eine kontinuierlich laufende Tropfinfusion einer 0,15 mmol/l NaCl-Lösung verhinderte die Thrombosierung dieses Katheters durch Blutkoagel [18].

Die linke Hand der Patienten befand sich während des gesamten Versuches in einer sogenannten „Hot-box“, einem mittels einer 100 Watt Glühbirne beheizbaren Holzkasten. Die „Hot-box“ reguliert über einen Thermostat die Lufttemperatur automatisch so, daß innerhalb der Box eine konstante Lufttemperatur von 55 °C herrscht. Diese Temperatur führt in der Haut der Hand zur Öffnung von arterio-venösen Shunts [18, 20, 21]. Hierdurch verringert sich die Differenz zwischen arterieller und venöser Blutglukosekonzentration, wodurch die Meßergebnisse der Blutglukosekonzentration aufgrund dieser physiologischen Reaktion im venösen Stromgebiet nahezu arterielle Werte erreichen.

Nachdem die Konnektion der Patienten mit dem Biostator vollständig abgeschlossen war, wurde das jeweilige Insulinpräparat in der entsprechenden Menge mit einer Dosierung von 0,3 U/kg subkutan mittels einer Insulinspritze (MICRO-FINE IV[®], Becton Dickinson Europe, Meylan Cedex, Frankreich) in eine abgehobene Hautfalte des linken Unterbauches senkrecht injiziert. Die Injektion wurde immer vom selben

Untersucher auf einer Linie zwischen Umbilicus und Spina iliaca anterior superior, 5-10 cm vom Bauchnabel entfernt, vorgenommen. Die verwendete Nadellänge betrug 13 mm.

Die basale intravenöse Insulininfusion wurde nach subkutaner Injektion von LM bzw. MM sofort gestoppt. Nach subkutaner Injektion von NPL- bzw. NPH-Insulin lief die basale Insulininfusion 30 min mit der zuletzt vor der subkutanen Injektion notwendigen Infusionsrate weiter, um ein Zeitintervall mit zu niedrigen Seruminsulinkonzentrationen zu vermeiden. Die um die Hälfte reduzierte Rate der basalen Insulininfusion wurde anschließend weitere 30 min infundiert und erst dann gestoppt.

Bei einem Glukosebedarf von mehr als 800 mg/min reichte die maximale Glukoseinfusionsrate (GIR) des Biostators nicht mehr aus, um den Blutglukosespiegel bei 90 mg/dl konstant zu halten. Um einer potentiell möglichen Hypoglykämie der Patienten vorzubeugen, wurde ab einer Pumpleistung von ca. 700 mg/min eine zusätzliche konstante Glukoseinfusion mittels eines Infusomaten (Infusomat, B. Braun, Melsungen) infundiert. Im Versuchsprotokoll wurden die zeitlichen Intervalle der manuell eingestellten Infusionsraten notiert. Üblicherweise wurde die Erhöhung der zusätzlichen 20%igen Glukoseinfusion in Schritten von 30 ml/h vollzogen. Bei der Auswertung wurde diese Glukosemenge zu der vom Biostator infundierten GIR dazu addiert [18]. Weiterhin wurden zur Hormonbestimmung regelmäßige, im Versuchsprotokoll zeitlich festgelegte Mengen an Blut abgenommen (s. Abbildung 2). Vor jeder Blutabnahme wurden jeweils 2 ml des mit Kochsalzlösung verdünnten Blutes mittels zweier hintereinander verbundener Drei-Wege-Hähne in eine separate Spritze aufgezogen. Erst danach wurde die notwendige Menge von nun unverdünntem Blut abgenommen. Die verdünnten 2 ml Blut wurden langsam rückinfundiert, um den Blutverlust der Patienten so niedrig wie möglich zu gestalten.

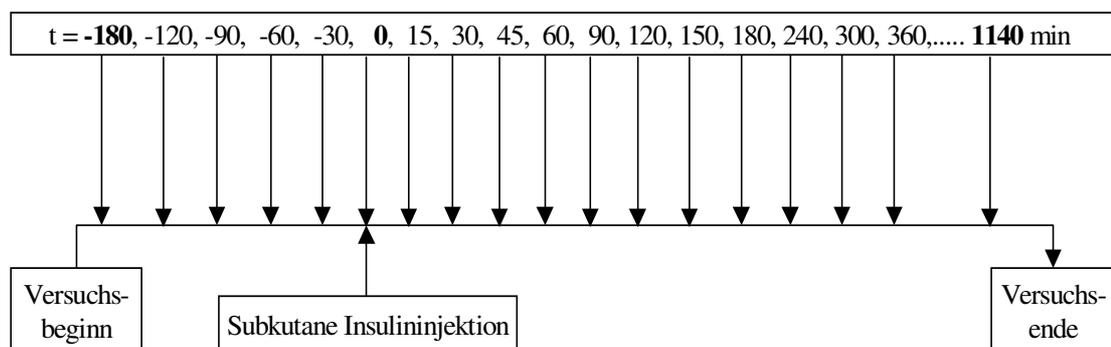
Die Patienten blieben während der gesamten Versuchsdauer von 22 h im Bett. Sie durften nichts essen, erhielten aber Mineralwasser nach Belieben. Der Versuch wurde regulär nach einer Gesamtdauer von 22 h beendet. Die Patienten schliefen in der Regel von 23 bis 7 Uhr.

Wenn sich im Verlauf des Glukose-Clamps die Tendenz einer kontinuierlich steigenden Blutglukosekonzentration abzeichnete, wurden die Patienten beim Erreichen oder Überschreiten einer Blutglukosekonzentration von 200 mg/dl vorzeitig vom Biostator diskonnektiert. Dieses Vorgehen wurde präventiv eingeführt, um die Patienten nicht über einen längeren Zeitraum einer Hyperglykämie auszusetzen.

2.6.3 Blutentnahmen

Die Intervalle, in denen die Blutproben für die Bestimmung von Freiem Immuno-reaktiven Insulin (FIRI), Freiem Insulin Lispro (FIL), Insulin Lispro-spezifischen Antikörpern, Humaninsulin-spezifischen Antikörper und kreuzreaktiven Antikörpern entnommen wurden, waren durch das Versuchsprotokoll zeitlich festgelegt (s. Abbildung 2). Zum Zeitpunkt $t = -180, -150, -120, -90, -60, -30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660, 720, 780, 840, 900, 960, 1020, 1080$ und 1140 min wurde den Patienten jeweils eine Blutprobe von ca. 5 ml entnommen, die in vorbereitete Abnahmeröhrchen (SST[®]-Röhrchen, Becton Dickinson, Meylan Cedex, Frankreich) gefüllt und nach einer halben Stunde Standzeit mit $4000 \text{ Umdrehungen} \cdot \text{min}^{-1}$ für 10 min zentrifugiert wurden. Das Plasma wurde abpipettiert und in Plastikröhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und bis zur Analyse tiefgekühlt gelagert. Nach dem Erreichen der stündlichen Intervalle zur Blutabnahme wurde alle 30 min eine zusätzliche Blutmenge von ca. 1 ml zur Kontrolle der Glukosemessung des Biostators abgenommen [18]. Der Gesamtblutverlust eines Probanden während eines Versuches betrug einschließlich der durch den Biostator für die kontinuierliche Messung der Blutglukosekonzentration entnommenen Menge von 2 ml/h ungefähr 231 ml, der Blutverlust während der gesamten Studie ca. 700 ml.

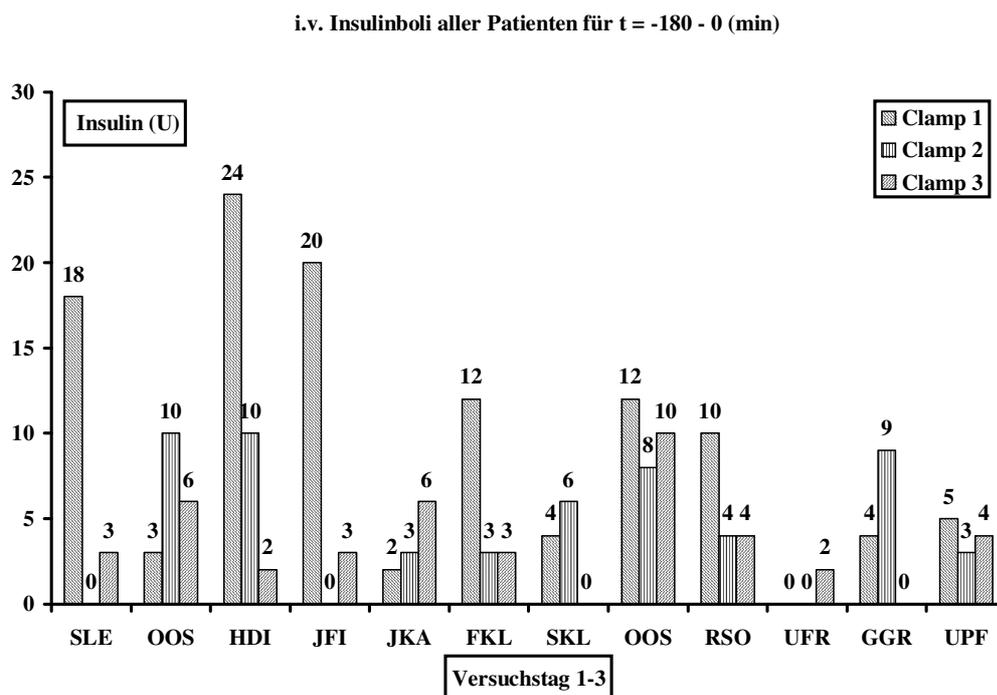
Abbildung 2 Zeitlicher Versuchsablauf mit den Entnahmezeiten der 5 ml Blutproben



2.7 Protokollverstöße

Es zeigte sich im Verlauf der Studie, daß eine Reihe von Patienten mit deutlich erhöhten Blutglukosewerten morgens in der Klinik eintrafen. Die basale Insulininfusion reichte in diesen Fällen nicht aus, um den erwünschten Startwert der Blutglukosekonzentration von 90 mg/dl zu etablieren. Der Studienarzt verabreichte in diesen Fällen zusätzlich zu der basalen Insulininfusion intravenös kleinere Mengen Humaninsulin (Humulin^R) im Bolus, um den erwünschten Blutglukosezielwert zu erreichen (s. Abbildung 3). Am ersten Clamptag wurden durchschnittlich $9,5 \pm 7,5$ (IE Insulin \pm SD) intravenös als Boli appliziert, am zweiten Clamptag $4,7 \pm 3,7$ und am dritten Versuchstag $3,6 \pm 2,7$.

Abbildung 3 Zusätzlich zur basalen Insulininfusion applizierte intravenöse Insulinboli



Die Kürzel stehen für die einzelnen Patienten und entsprechen der Reihenfolge in Tabelle 1.

2.8 Unerwünschte Vorkommnisse

Die Patienten wurden an den Versuchstagen 2, 3 und 4 jeweils über physische oder psychische Besonderheiten in der Zeit zwischen den einzelnen Versuchstagen befragt. Jedes von Seiten der Teilnehmer berichtete unerwünschte klinische Ereignis

wurde ebenso wie jede zusätzlich notwendige Medikamenteneinnahme dokumentiert. Während der einzelnen Versuchstage wurden alle den Patienten betreffenden besonderen Ereignisse in einem Versuchsprotokoll schriftlich festgehalten.

Im Verlauf der Studie gab es keine ernsthaften klinischen Vorkommnisse oder Zwischenfälle. In Tabelle 4 sind alle während des Zeitraumes der gesamten Studie aufgetretenen, behandlungsbedürftigen Ereignisse aufgeführt. Keines davon führte zu bleibenden Schäden oder konnte in direkten Zusammenhang mit der Studie gebracht werden.

Tabelle 4 Behandlungsbedürftige Ereignisse

Klinische Bezeichnung	Patientenanzahl	Anzahl der Ereignisse
Allergische Rhinitis	1	1
Zystitis	1	1
Asthma Bronchiale	1	1

2.9 Analytische Methoden

2.9.1 Glukose

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im arteriell-venösen Mischblut erfolgt durch den Glukosesensor des Biostators. Das heparinisierte, mit einer fertigen Pufferlösung im Verhältnis 1:10 versetzte Blut wird von einer Pumpe des Biostators kontinuierlich zu dem Glukosesensor gefördert. Der Glukosesensor enthält eine austauschbare Membran, die aus zwei Schichten besteht, zwischen denen sich das Enzym Glukoseoxidase in einer gelförmigen Trägersubstanz befindet. Die durch die Membran diffundierende Glukose wird mittels des Enzyms Glukose-Oxidase oxidiert, wobei es unter anderem zur Ausbildung von Wasserstoffperoxid kommt. Eine an einer Platin/Silber-Elektrode angelegte Spannung von 700 mV läßt das entstandene Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff zerfallen. Die dabei frei werdenden Elektronen bewirken einen Stromfluß im nA-Bereich, der sich zu der Plasmaglukosekonzentration direkt proportional verhält. Nach entsprechender vorheriger Kalibrierung gibt der Biostator den gemessenen Stromfluß als Blutglukosekonzentration an [18].

Der Wert wird mit einer zweiminütigen Zeitverzögerung angezeigt, die durch die Pumpstrecke von der Blutentnahmestelle des Patienten bis zur Membran des Biostators zustande kommt. Um Meßfehlern des Biostators entgegenzuwirken, wurden in regelmäßigen Abständen parallele Messungen mit einem Beckman Glukoseanalyzer (Beckman Glukoseanalyzer, Fullerton, Kalifornien, USA) durchgeführt. Dazu wurde dem Patienten eine Blutprobe von ca. 1 ml entnommen und die Blutglukosekonzentration mit dem Beckmann Glukoseanalyzer bestimmt, dessen Analyseverfahren ebenfalls auf der Glukose-Oxidase-Reaktion basiert. Die so ermittelten Werte wurden mit den Meßergebnissen des Biostators verglichen und eventuell anpassende Justierungen seitens des Biostators vorgenommen.

2.9.2 Insulin

Bei dieser Studie wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Freiem Immunoreaktivem Insulin (FIRI) und von Freiem Insulin Lispro (FIL) durchgeführt. Die gesammelten Serumproben wurden in gefrorenem Zustand der Analyse zugeführt. Nach dem Auftauen wurden alle Proben mit einer 20%igen Polyethylenglykollösung behandelt, um eventuell vorhandene Insulinantikörper auszufällen [22].

2.9.2.1 Freies Insulin

Die FIRI-Serumkonzentration wurde mittels eines „Doppelten Antikörper Radio-Immunoassays (RIA)“ bei Phoenix International Life Science Inc., Montreal, Quebec, Kanada, bestimmt. Die verwendete Bestimmungsmethode wurde von Diagnostic Products Corporation (DPC), Los Angeles, USA entwickelt. Der benutzte Assay zur Konzentrationsbestimmung von FIRI besitzt eine 100%ige Kreuzreaktivität für Humaninsulin und Insulin Lispro. Die unterste Nachweisgrenze betrug bei diesem Analyseverfahren 0,5 ng/ml. Die FIRI-Konzentration wurde standardisiert bei allen entnommenen Proben in der Zeit vor Applikation der Testinsuline ($t = -180 \dots 0$ min) und bei den Proben nach Applikation von NPH-Insulin ($t = -180 \dots 1140$ min) bestimmt.

2.9.2.2 Freies Insulin Lispro

Die Serumkonzentration von FIL wurde standardisiert nach Injektion von LM, MM und NPL-Insulin bestimmt ($t = 0 \dots 1140$ min). Zur Messung von Insulin Lispro wurde ein spezieller RIA entwickelt, der gegen Insulin Lispro spezifische Antikörper

verwendet. Diese Antikörper weisen nur eine minimale Kreuzreaktivität mit Humaninsulin auf. Die Analysen wurden bei Lilly Research Laboratories, Indianapolis, USA durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze für Freies Insulin Lispro lag bei 0,1 ng/ml.

2.9.3 Insulinantikörper

Die Bestimmung von Insulinantikörpern im Serum erfolgte bei allen Teilnehmern aus den beim jeweiligen Screeningtermin entnommenen Serumproben im Corning-Nichols Institute, San Capistrano, Kalifornien, USA. Zu diesem Zwecke wurde ebenfalls ein spezieller RIA verwendet. Es wurden Analysen für kreuzreaktive, Humaninsulin-spezifische und Insulin Lispro-spezifische Antikörper durchgeführt.

2.10 Pharmakodynamische Methoden

2.10.1 Blutglukose

Für jede Insulinformulierung wurden die Mittelwerte der Blutglukosekonzentration für 3-stündige Intervalle berechnet. Diese Werte wurden für die Zeit von $t = 0-3$, $3-6$, $6-9$, $9-12$, $12-15$ und $15-19$ h errechnet. Das letzte Intervall betrug 4 h. Zusätzlich wurden die Berechnungen für ein 8-stündiges Intervall für $t = 0-8$ h vorgenommen.

Da die Blutglukosekonzentration in einigen Fällen innerhalb der Versuchsdauer Werte von 200 mg/dl überschritt, wurde in diesen Fällen der Versuch vorzeitig abgebrochen (s. 2.6.2). Es kam dadurch zu unvollständigen Datensätzen, weil die verbleibenden Werte der Blutglukosekonzentration für die Zeit bis zum regulären Versuchsende fehlten. Aufgrund dieser Tatsache wurden die Mittelwerte der Blutglukosekonzentration anhand zweier unterschiedlicher Vorgehensweisen für die jeweiligen Zeitintervalle bestimmt. Bei der ersten Vorgehensweise wurden die Mittelwerte der Blutglukosekonzentration nur mit den gemessenen Daten für das jeweilige Intervall berechnet. Nach dem vorzeitigen Versuchsende wurden keine weiteren Werte in die Berechnungen mit einbezogen. Bei der zweiten Vorgehensweise wurde nach der Methodik des „last-value-carried-forward“ der zuletzt gemessene Blutglukosekonzentrationswert vor dem vorzeitigen Versuchsende für den verbleibenden Zeitraum bis zum regulären Versuchsende nach 22 h als fixer Wert angenommen und für den Zeitraum bis zum Versuchsende weitergeführt. Die

Berechnungen der Mittelwerte der Blutglukosekonzentration wurden dann mit den adjustierten Datensätzen für die jeweiligen Intervalle durchgeführt.

2.10.2 Glukoseinfusionsraten

Von den Glukoseinfusionsraten, die zur Beibehaltung der Euglykämie notwendig waren, wurden die maximale Infusionsrate (GIR_{max}) und die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Infusionsrate ($tGIR_{max}$) berechnet. Dazu wurden Mittelwerte der Glukoseinfusionsraten in 5- und 15-minütigen Intervallen bestimmt. Die Werte der 5-minütigen Intervalle zeigten einen hohen Anteil an Variabilität, der durch die automatische minütliche Nachjustierung der Glukoseinfusionsrate des Biostators verursacht wurde. Durch Erweiterung der Mittelungsintervalle auf 15 min wurde dieses unerwünschte „Rauschen“ deutlich reduziert.

Die vom Biostator gesteuerte Glukoseinfusion wurde automatisch beim Überschreiten des Zielwertes von 90 mg/dl reduziert und bei längerem Überschreiten gestoppt. Ein vorzeitiges Versuchsende aufgrund einer Blutglukosekonzentration von >200 mg/dl hatte keinen Einfluß auf die Berechnungen von GIR_{max} und $tGIR_{max}$.

2.10.3 Gesamtmenge an infundierter Glukose

Die kumulative Menge ($G_{tot0-19 h}$) an infundierter Glukose wurde bis zum Ende des jeweiligen Versuches aufgezeichnet. Ähnlich den partiellen AUC-Werten der Seruminsulinkonzentration wurden auch für die $G_{tot0-19}$ -Werte Berechnungen für unterschiedliche Zeitintervalle angestellt, die Beschreibungen der Wirkprofile der verwendeten Insulinformulierungen zulassen. Diese Intervalle wurden für die Zeit von $t = 0-5$ h und für $t = 5-19$ h berechnet (G_{tot0-5} und $G_{tot5-19}$). Ein vorzeitiges Versuchsende hatte wie bei den Berechnungen von GIR_{max} und $tGIR_{max}$ keinen Einfluß auf die Ergebnisse.

2.10.4 Freies Insulin

Die Konzentration von FIRI wurde bei allen in der Vorlaufphase der Versuche ($t = -180...0$ [min]) gewonnenen Serumproben bestimmt. In den Proben nach Applikation von NPH-Insulin wurden die Bestimmungen zusätzlich für den verbleibenden Versuchszeitraum durchgeführt. Allerdings ergaben viele Messungen keine Werte oberhalb des Detektionslimits der Bestimmungsmethode. 83% der Konzentrationswerte konnten nicht ermittelt werden! Daher können keine quantitativen Aussagen

über die pharmakokinetischen Parameter C_{\max} , t_{\max} und die FIRI-AUC-Werte bei den Versuchen mit NPH-Insulin gemacht werden.

2.10.5 Freies Insulin Lispro

Bei der Bestimmung der FIL-Konzentration wurde eine andere Nachweismethode mit einer fünffach höheren Sensitivität verwendet, doch trotz der höheren Sensitivität wurden keine nachweisbaren FIL-Konzentrationen bei 304 Messungen von 635 möglichen Blutproben gemessen, was 47,9% entspricht! Ein fehlendes Meßergebnis wurde a priori bei jedem Datensatz (ein Datensatz entspricht allen gesammelten Blutproben eines Patienten pro Versuch) erwartet, da zum Zeitpunkt der Applikation des Testinsulins ($t = 0$ h) noch kein Freies Insulin Lispro vorhanden sein konnte.

Bei 5 Datensätzen (4 Patienten erhielten NPL-Insulin, 1 Patient LM) ergaben sich jeweils nur drei oder weniger Blutproben mit nachweisbaren Insulinkonzentrationen oberhalb des Detektionslimits. Die Bestimmungen für C_{\max} und t_{\max} wurden nur mit Datensätzen durchgeführt, die mindestens einen Wert oberhalb der unteren Nachweisgrenze beinhalteten. Berechnungen für AUC wurde nur angestellt mit mindestens drei oberhalb des Detektionslimits liegenden Werten.

2.10.6 Vorzeitig beendete Versuche

Die Patienten wurden bei einem vorzeitig beendeten Versuch vom Biostator diskonnektiert, wenn die Blutglukosekonzentration nach Verabreichung des jeweiligen Testinsulins einen Wert von 200 mg/dl überschritt (s. 2.6.2). Es wurden dann keine weiteren Blutproben mehr abgenommen.

2.11 Pharmakokinetische Methoden

Zwischen den verschiedenen Formulierungen wurden die Werte von C_{\max} und t_{\max} zum Vergleich herangezogen. Die Fläche unterhalb der Seruminsulinkonzentration-versus-Zeit-Kurve wurde für das Intervall vom Zeitpunkt der Applikation ($t = 0$ h) bis zum Zeitpunkt, an dem die Insulinkonzentration wieder den Basiswert ($t = t'$) erreicht hatte, bestimmt. Der Basiswert (t') wurde in diesem Fall als diejenige Seruminsulinkonzentration definiert, die möglichst nahe oder unter dem zum Zeitpunkt $t = 0$ h gemessenen Wert liegt. Individuelle Flächenberechnungen ($AUC_{t_1-t_2}$) wurden für jeden Patienten mittels der Trapezregel durchgeführt. $AUC_{0-t'}$

repräsentiert die Summe dieser einzelnen Flächen. Zusätzlich zu den AUC_{0-t} -Werten wurden AUC-Werte für abschnittsweise definierte, Zeitintervalle berechnet. Diese Intervalle beinhalten die Zeit von $t = 0-5$ (AUC_{0-5}) und $t = 5-t'$ ($AUC_{5-t'}$). Die Daten der berechneten partiellen AUC's reflektieren die Wirkprofile der schnellen und verzögerten Absorptionsphase der unterschiedlichen Anteile von Insulin Lispro und NPL-Insulin in den verschiedenen Formulierungen. Das Intervall für $t = 0-5$ h wurde ausgewählt, da die maximale Wirkdauer der Aktivität von Insulin Lispro bei 4-5 h liegt [11, 23]. Zusätzlich ist dieser Zeitraum typisch für den Abstand zwischen zwei Mahlzeiten. Das Intervall für $t = 5-t'$ wurde ausgewählt, um die metabolische Aktivität der unterschiedlichen Anteile des Verzögerungsinsulins zu bestimmen.

Die pharmakokinetischen Kenngrößen wurden mittels eines von Eli Lilly & Co. entwickelten Programmes (MIKAPC, Version 1.1) berechnet.

2.12 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der pharmakokinetischen und glukodynamischen Kenngrößen wurde eine Varianzanalyse verwendet. Basierend auf dem balancierten, inkompletten Blockstudiendesign wurde bei dem statistischen Modell die Behandlung (dies entspricht dem jeweiligen Insulinpräparat) als feste und die Patienten als zufällige Größe angesehen.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SAS[®] (Statistical Analysis Systems, Cary, North Carolina, USA) durchgeführt.

Die Verabreichung von Insulin in der Vorlaufphase des Versuches ($t = -180...0$ [min]) sowohl als i.v. Infusion als auch als intravenöse Boli bewirkten eine metabolische Wirkung, die bis zu einigen Stunden anhielt. Dies erschwert die Interpretation der Glukoseinfusionsraten, die nach der s.c. Applikation des Testinsulins registriert wurden. Zur Kompensation dieses unerwünschten metabolischen Effektes wurde die bekannte Wirkung von i.v. appliziertem Insulin von den registrierten Glukoseinfusionsraten durch Verwendung eines geeigneten Modells berücksichtigt.

Aufgrund der dabei fortgeführten basalen Insulininfusion wurde bei den Versuchen mit NPL- und NPH-Insulin der Startzeitpunkt für die Kalkulation von G_{tot} , GIR_{max}

und partiellen G_{tot} -Werten auf eine Stunde nach der s.c. Applikation des jeweiligen Testinsulins festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Blutglukosekonzentration

Die Blutglukose verblieb in den ersten 8 h nach Applikation der vier verschiedenen Insulinformulierungen annähernd bei dem Ausgangswert von 90 mg/dl (s. Abbildung 4). Ebenfalls wird dies in Tabelle 5 durch die mittleren Blutglukosekonzentrationswerte der dreistündigen Intervalle in der Zeit von $t = 0-3$, $3-6$, $6-9$ und $0-8$ h belegt. Die statistische Auswertung zeigte, daß nach Applikation von NPH-Insulin innerhalb dieses Zeitraumes eine höhere maximale Blutglukosekonzentration als bei den anderen Insulinformulierungen erreicht wurde. Nach 15 h erreichte die Blutglukosekonzentration bei Applikation von MM die höchsten Werte.

Abbildung 4 Mittlere Blutglukosekonzentrationen nach der s.c. Applikation der vier Insulinformulierungen

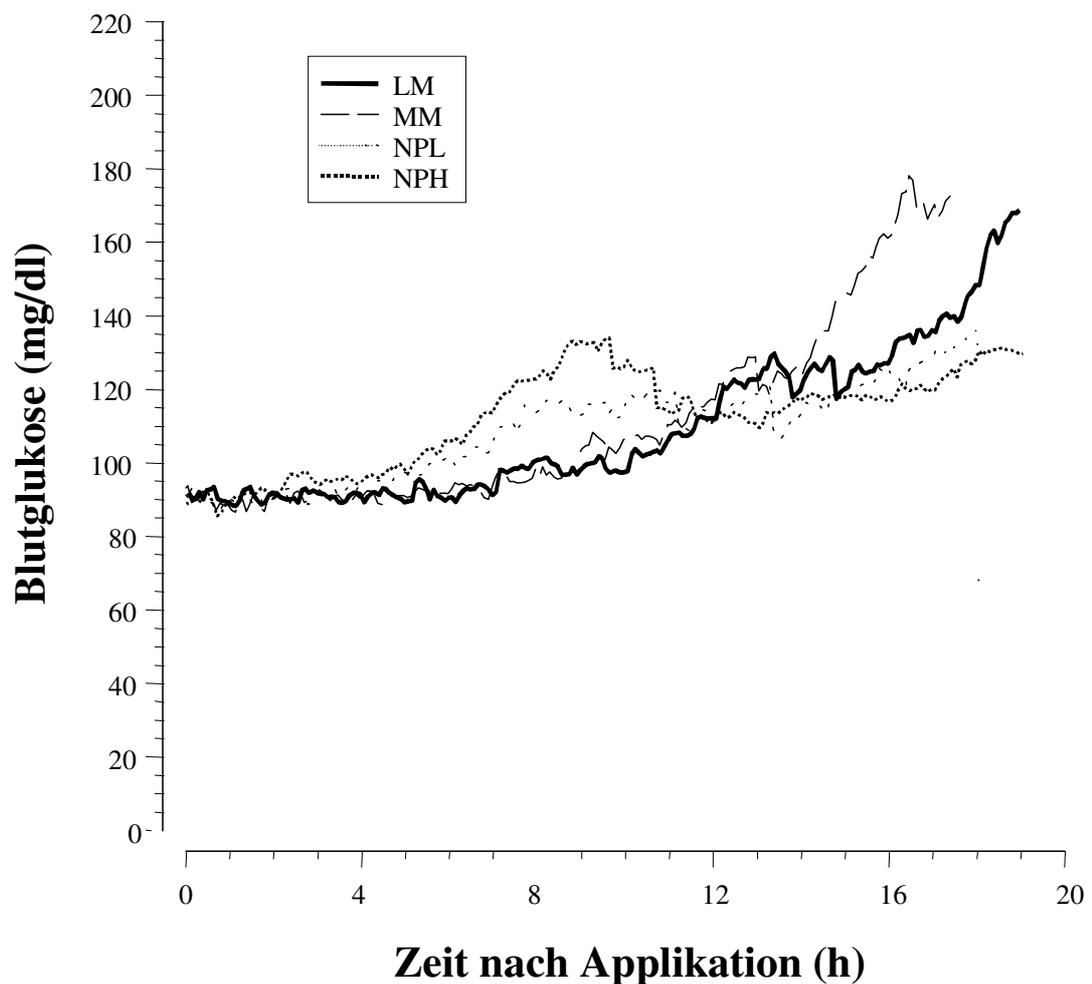


Tabelle 5 Mittelwerte der Blutglukose \pm SD (mg/dl) für unterschiedliche Zeitintervalle

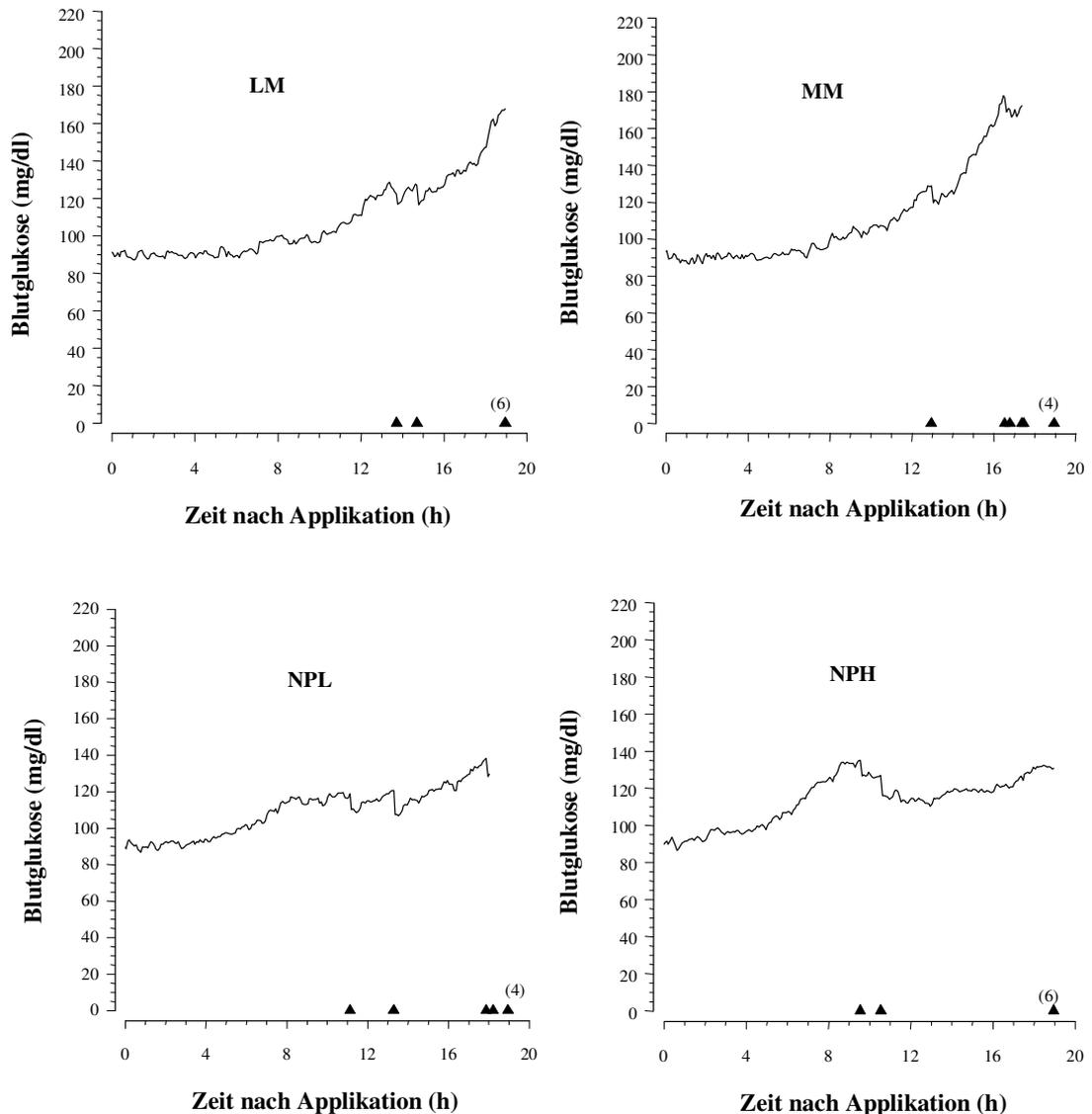
Zeit (h)	NPH	N	NPL	N	LM	N	MM	N
0-3	93 \pm 4	9	91 \pm 2	9	90 \pm 1	9	90 \pm 1	9
3-6	100 \pm 17	9	96 \pm 7	9	90 \pm 1	9	91 \pm 1	9
6-9	121 \pm 25	9	110 \pm 22	9	95 \pm 8	9	97 \pm 8	9
9-12	133 \pm 41	9	117 \pm 34	9	103 \pm 15	9	108 \pm 20	9
12-15	116 \pm 27	7	121 \pm 36	8	126 \pm 35	9	132 \pm 31	9
15-19	124 \pm 28	7	130 \pm 34	7	140 \pm 23	7	169 \pm 23	8
0-8	101 \pm 13	9	96 \pm 7	9	91 \pm 2	9	91 \pm 1	9

N steht für die Anzahl der Patienten zu Beginn des jeweiligen Zeitintervalls.

Die Versuche wurden beim Erreichen einer Blutglukosekonzentration von >200 mg/dl abgebrochen. Dadurch ergaben sich unvollständige Datensätze in der Zeit vom vorzeitigen Versuchsabbruch bis zum geplanten Versuchsende bei $t = 19$ h. Die in Abbildung 4 und 5 dargestellten Kurvenverläufe zeigen die durch die fehlenden Daten beeinflussten Tendenzen. So kann in Abbildung 4 und 5 in der Zeit zwischen 13 und 16 h für LM, zwischen 12 und 14 h für MM, zwischen 10 und 14 h für NPL-Insulin und zwischen 9 und 12 h für NPH-Insulin anhand der absinkenden mittleren Blutglukosewerte eine vermeintlich wieder verstärkt einsetzende Stoffwechselwirkung des jeweiligen Insulins angenommen werden. Dies ist aber durch die nicht mehr in die Berechnung der Mittelwerte mit eingehenden hohen Blutglukosewerte der vorzeitig beendeten Versuche bedingt. Die Daten in Abbildung 4 und 5 sowie in Tabelle 5 beinhalten nur die gemessenen Blutglukosewerte. Die fehlenden Werte bis zum geplanten Versuchsende der Patienten, bei denen es zu einem vorzeitigen Abbruch kam, wurden nicht weiter berücksichtigt. Dies führt dazu, daß die aus diesen Daten berechneten Mittelwertskurven die „reale“ Stoffwechselwirkung bei einigen Patienten nicht adäquat darstellen. Deshalb wurden die Daten erneut unter der Annahme analysiert, daß der bei den abgebrochenen Versuchen zuletzt gemessene Blutglukosewert für den verbleibenden Zeitraum bis zum regulären Versuchsende (bei $t = 19$ h) die Stoffwechselwirkung des getesteten Insulins widerspiegelt (s. 2.10.1). Obwohl die „realen“ Blutglukosewerte bei dieser Vorgehensweise nicht gemessen wurden, wird durch die Methode des „last-value-carried-forward“ die

aufgetretene Stoffwechselwirkung der Insulinformulierungen und somit die Stoffwechselsituation der Probanden am ehesten berücksichtigt.

Abbildung 5 Mittlere Blutglukosekonzentrationen mit individuellen Abbruchzeiten der Patienten bei vier verschiedenen Insulinformulierungen

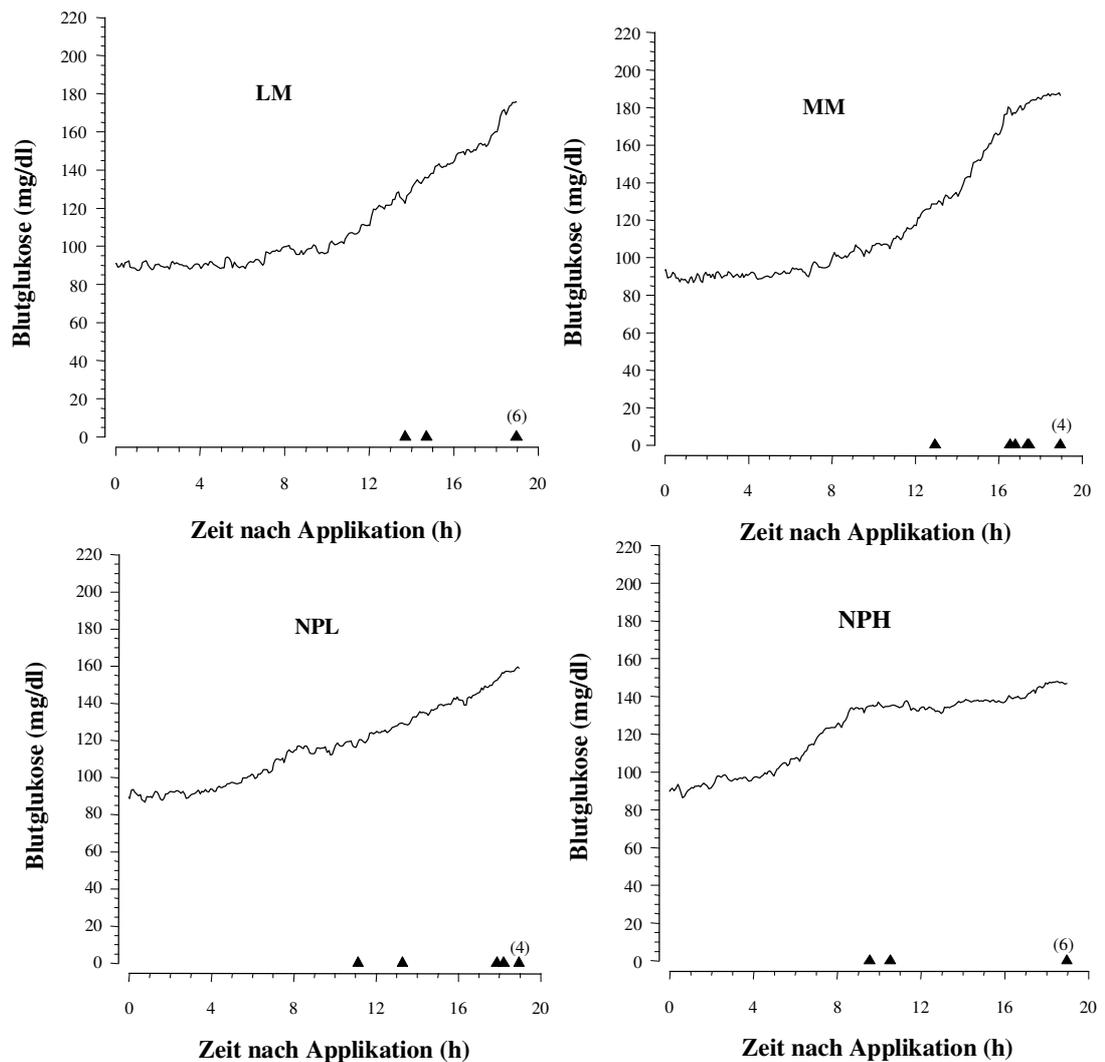


Die ausgefüllten Dreiecke zeigen die jeweiligen individuellen vorzeitigen Versuchsabbrüche aufgrund einer erreichten Blutglukosekonzentration von >200 mg/dl an. Die Zahl in runden Klammern gibt die Anzahl derjenigen Patienten wieder, die den Versuch regulär beendeten.

In Abbildung 6 werden die mittleren Blutglukosekonzentrationen aller Patienten mit den adjustierten Datensätzen dargestellt. Im Vergleich mit Abbildung 5 zeigen die Kurven von LM, MM und NPL-Insulin in der Zeit von 0 bis ca. 9 h nach der Insulinapplikation einen nur leichten Anstieg, der in der verbleibenden Zeit für LM und MM steiler, für NPL-Insulin etwas flacher ausfällt. In Tabelle 6 wird dies bei den

berechneten Mittelwerten für die jeweiligen Intervalle deutlich. Höhere Blutglukosekonzentrationswerte kommen im Vergleich mit Tabelle 5 in der Zeit zwischen 12 und 19 h vor, was dem Zeitraum entspricht, in dem die meisten Versuche vorzeitig abgebrochen wurden.

Abbildung 6 Mittlere Blutglukosekonzentrationen mit adjustierten Datensätzen bei vier verschiedenen Insulinformulierungen



Die ausgefüllten Dreiecke zeigen die jeweiligen individuellen vorzeitigen Versuchsabbrüche aufgrund einer erreichten Blutglukosekonzentration von >200 mg/dl. Die Zahl in runden Klammern gibt die Anzahl derjenigen Patienten wieder, die den Versuch regulär beendeten.

Bei der Applikation von NPH-Insulin beginnt der Verlust der Insulinwirkung zwischen 8 und 11 h (s. Abbildung 6), mit scheinbar kurz darauf zurückkehrender Stoffwechselkontrolle. Trotz der Adjustierung der Datensätze wird die mittlere Blutglukosekonzentration offensichtlich stark durch die beiden Patienten beeinflusst, die

im Zeitraum zwischen 9 und 11 h nach Applikation des jeweiligen Testinsulins den Versuch vorzeitig beendeten. Die oben angeführten Tendenzen werden aber durch die Weiterführung der nach Abbruch der Versuche zuletzt gemessenen Werte deutlich minimiert (Vergleiche Tabelle 5 und 6).

Tabelle 6 Mittelwerte der Blutglukose (mg/dl) für unterschiedliche Zeitintervalle mit adjustierten Datensätzen

Zeit (h)	N	NPH	NPL	LM	MM
0-3	9	93 ± 4	91 ± 2	90 ± 1	90 ± 1
3-6	9	100 ± 17	95 ± 7	90 ± 1	91 ± 1
6-9	9	121 ± 25	110 ± 22	95 ± 8	97 ± 8
9-12	9	135 ± 43	117 ± 34	103 ± 15	108 ± 20
12-15	9	135 ± 45	130 ± 44	126 ± 35	133 ± 33
15-19	9	142 ± 42	147 ± 45	154 ± 35	176 ± 27
0-8	9	101 ± 13	96 ± 7	91 ± 2	91 ± 1

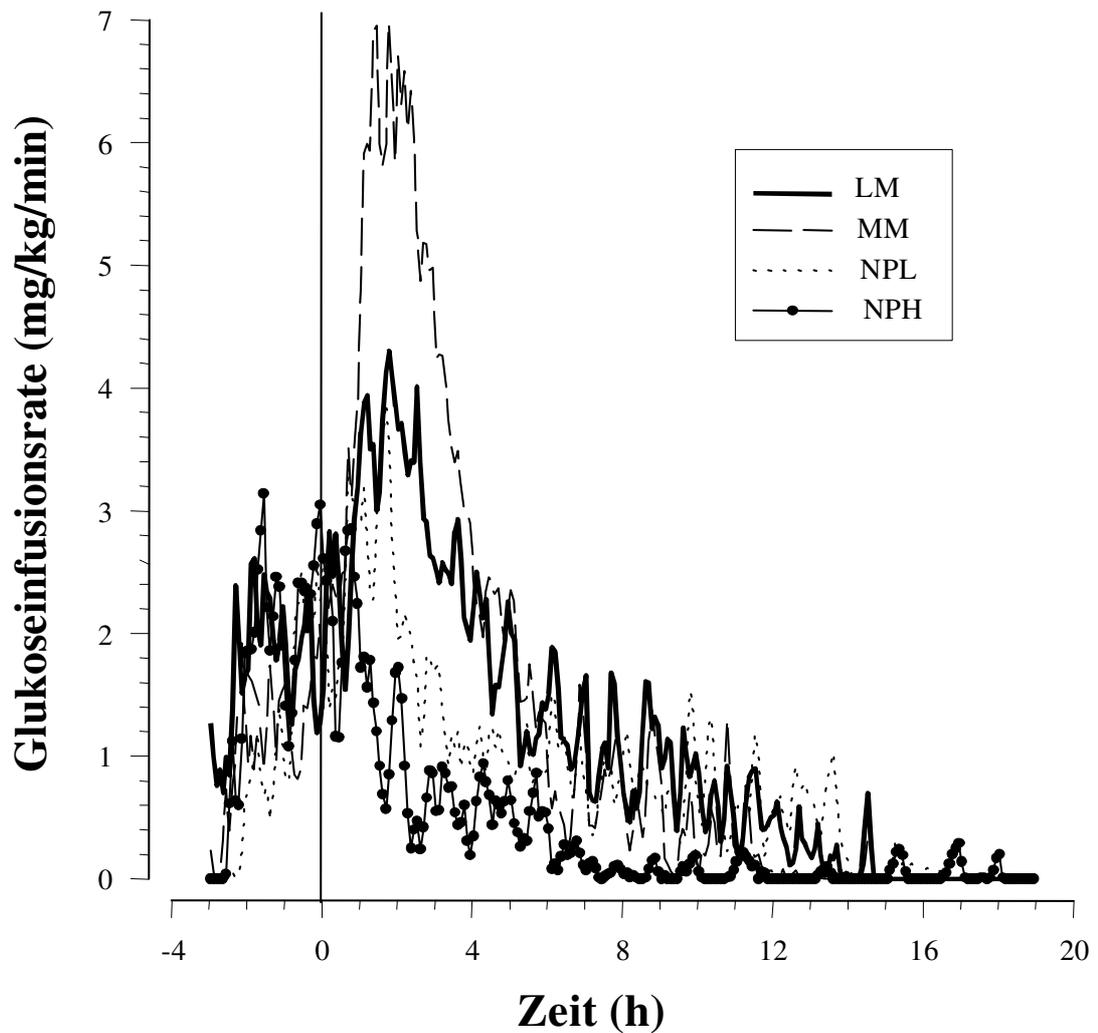
3.2 Glukoseinfusionsraten

Die in Abbildung 7 dargestellten Verläufe der mittleren GIR reflektieren zum Zeitpunkt $t = 0$ h zwei unterschiedliche Effekte. Die basale i.v. Insulininfusion und die i.v. Bolusgabe von Humulin^R, welche in der Versuchsvorlaufzeit von $t = -3...0$ h appliziert wurden, induzieren jeweils einen eigenständigen, glukodynamischen Effekt. Bei einigen Patienten verursacht die Summation dieser Insulingaben einen Überhang der metabolischen Insulinwirkung in die eigentliche Versuchszeit hinein. In der ersten Zeit nach der subkutanen Applikation der Testinsuline führt dies zu einer zusätzlichen unerwünschten Insulinwirkung. Dies zeichnet sich in Abbildung 7 durch die erhöhte Glukoseinfusionsrate zum Zeitpunkt der Verabreichung der Testinsuline bei $t = 0$ h ab.

Wie unter 2.12 erläutert, wurde der glukodynamisch relevante Einfluß der Insulingaben in der Vorlaufphase und in der Anfangsphase nach Applikation der Testinsuline durch Einsatz eines geeigneten Modells berücksichtigt. Die Adjustierungen wurden für jeden Versuch einzeln durchgeführt. Die mittleren GIR der sich daraus ergebenden Datensätze sind in Abbildung 8 und 9 dargestellt. Es zeigte sich, daß das verwendete Modell zu einer deutlichen Reduktion der GIR in der

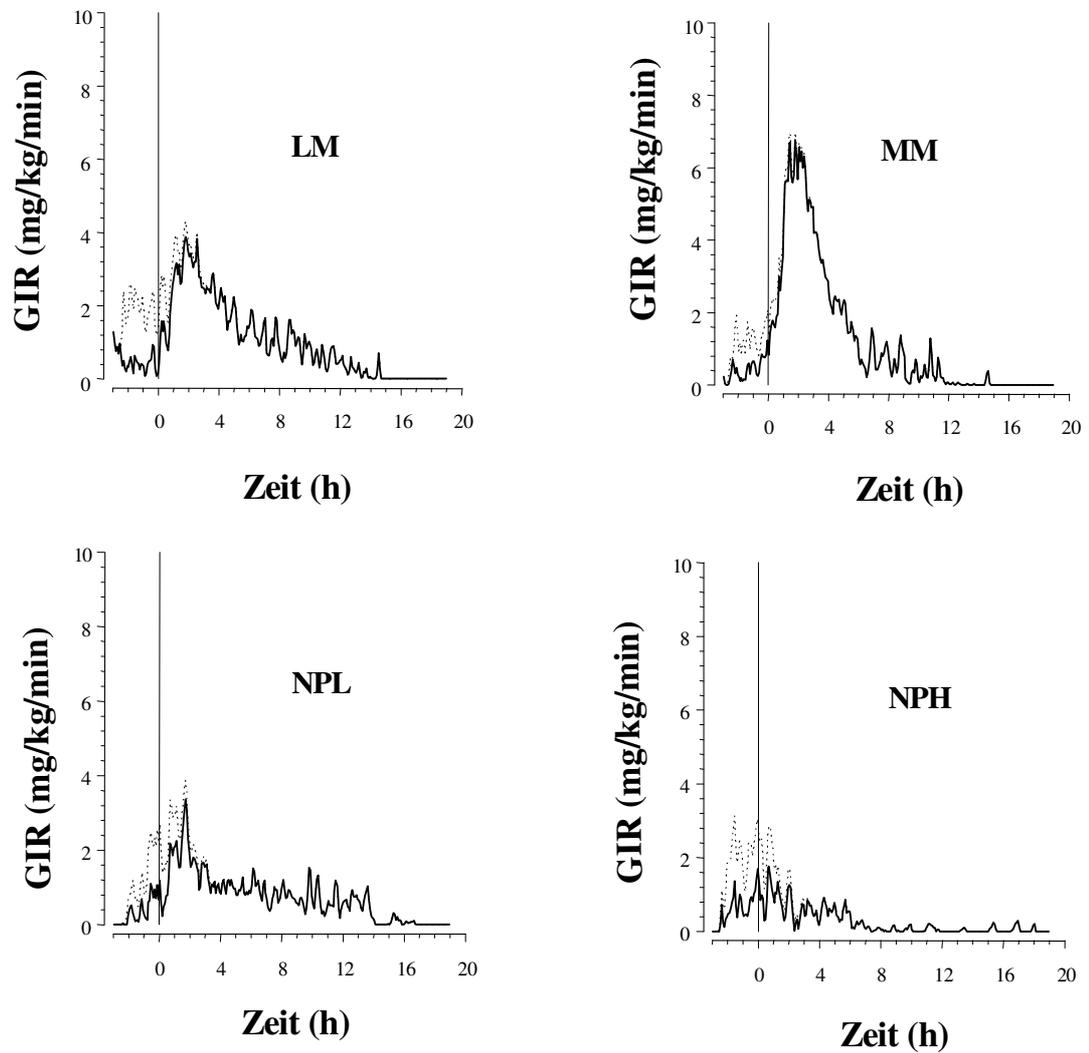
Vorlaufphase der Versuche und in der Anfangsphase kurz nach der s.c. Applikation der Testinsuline führte. Die eigentlichen Wirkprofile der vier untersuchten Insulinformulierungen werden durch die so gewonnenen Datensätze besser reflektiert (s. Abbildung 7, 8 und 9).

Abbildung 7 Mittlere Glukoseinfusionsraten nach s.c. Applikation der vier verschiedenen Insulinformulierungen



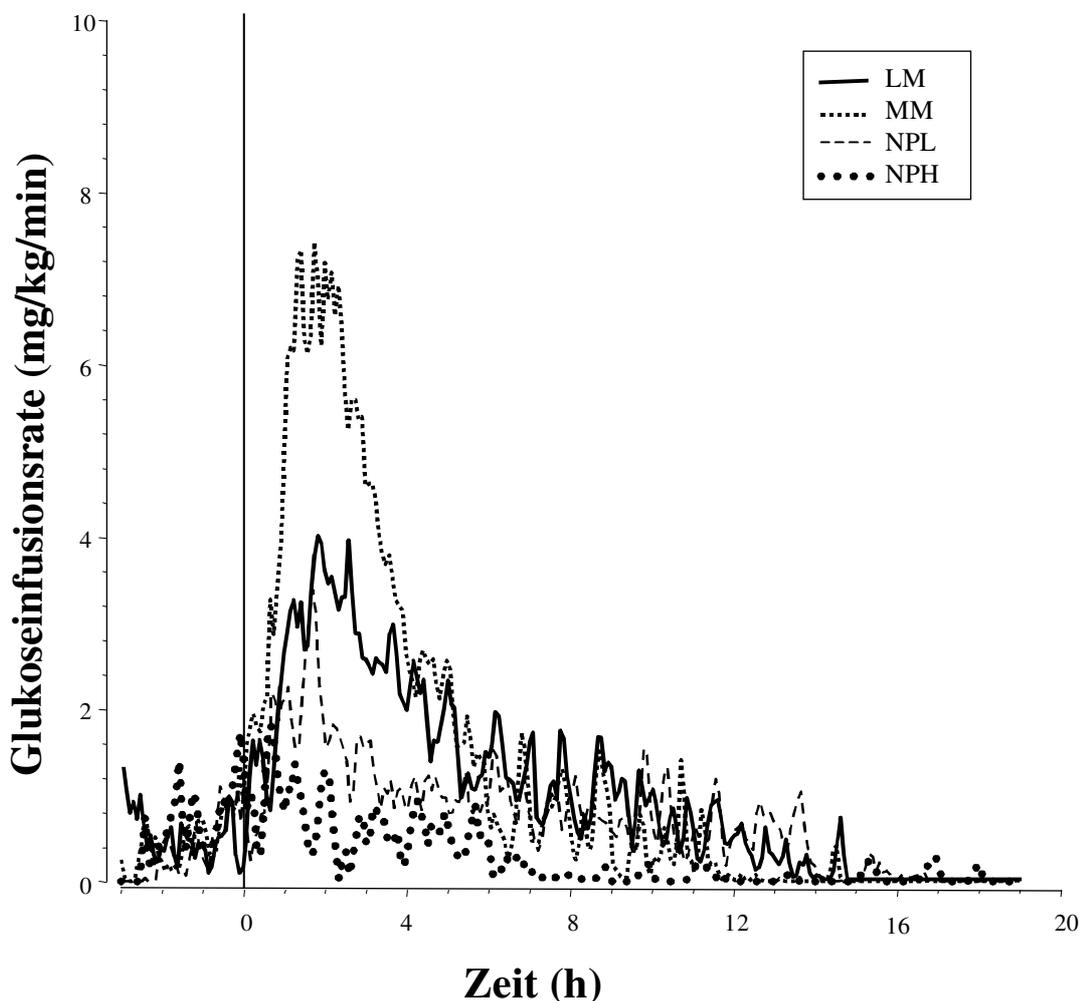
Der Zeitpunkt der Applikation des jeweiligen Testinsulins wird durch die senkrechte Linie bei $t = 0$ h verdeutlicht.

Abbildung 8 Mittlere Glukoseinfusionsraten mit adjustierten Datensätzen bei vier verschiedenen Insulinformulierungen



Die gepunktete Linie stellt die registrierten GIR, die durchgezogene Linie die GIR mit adjustierten Datensätzen dar. Der Zeitpunkt der Applikation des jeweiligen Testinsulins wird durch die senkrechte Linie bei $t = 0$ h verdeutlicht.

Abbildung 9 Mittlere Glukoseinfusionsraten aller Insulinformulierungen mit adjustierten Datensätzen



Der Zeitpunkt der Applikation des jeweiligen Testinsulins wird durch die senkrechte Linie bei $t = 0$ h verdeutlicht.

Die Mittelwerte der GIR zeigen ein Maximum von ca. 7 mg/kg/min nach Applikation von MM innerhalb der ersten 3 h. Die Mittelwerte von LM weisen im gleichen Zeitraum ein Maximum von 4, für NPL-Insulin von 3,2 und für NPH-Insulin von 1,4 mg/kg/min auf.

In Tabelle 7 sind die glukodynamischen Kenngrößen für 15-minütige Intervalle zusammenfassend dargestellt. Die 15-minütigen Intervalle wurden deshalb gewählt, um die durch die minütliche Nachjustierung des Biostators verursachten Schwankungen in der GIR zu dämpfen (s. 2.10.2). Es zeigt sich, daß die Werte für GIR_{max} bei MM am höchsten sind, gefolgt von LM, NPL- und NPH-Insulin. Die Werte für $tGIR_{max}$

weisen einen unerwartet frühen Zeitpunkt bei NPH-Insulin auf, mit ähnlichen Werten, wie sie bei MM beobachtet wurden (s. Tabelle 7).

Tabelle 7 Glukodynamische Parameter der vier untersuchten Insulinformulierungen

Dosierung: 0,3 U/kg

	MM	LM	NPL	NPH
GIR_{max} (mg/kg/min)	7,7 ± 2,2	4,9 ± 2,2	4,1 ± 2,3	3,2 ± 0,8
tGIR_{max} (min)	113 ± 30	158 ± 98	225 ± 236	107 ± 124
G_{tot0-19 h} (g/kg)	1,5 ± 0,4	1,3 ± 0,9	0,8 ± 1,0	0,3 ± 0,2
G_{tot0-5 h} (g/kg)	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,2 ± 0,1
G_{tot5-19 h} (g/kg)	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,6	0,4 ± 0,6	0,1 ± 0,1

Die Berechnungen für die aufgeführten Werte (Mittelwert ± SD) wurden mit den adjustierten Daten durchgeführt.

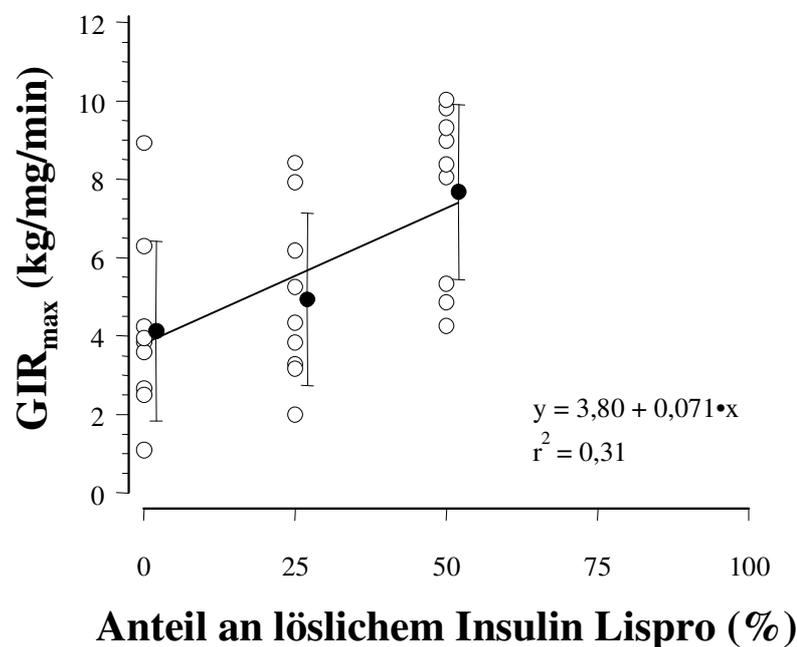
Die in Tabelle 7 angegebenen G_{tot0-19}-Werte sind für MM am höchsten und nehmen in der Reihenfolge LM, NPL- und NPH-Insulin ab. Die Werte für G_{tot0-5} zeigen die gleiche Reihung. Im Gegensatz dazu erreicht LM den höchsten Wert bei den G_{tot5-19}-Mittelungsintervallen, gefolgt von NPL-Insulin, MM und NPH-Insulin.

3.3 Vergleich der vier Insulinformulierungen

Bei den 15-minütigen Mittelungsintervallen steigen die GIR_{max}-Werte mit zunehmendem Anteil an löslichem Insulin Lispro in den Formulierungen an (MM>LM >NPL-Insulin, s. Abbildung 10). Diese Zunahme ist aber trotz linearer Steigung von GIR_{max} nicht direkt proportional zum prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro. Dies bedeutet, daß bei einer Verdoppelung des Anteils an Insulin Lispro keine Verdoppelung von GIR_{max} resultiert. Die maximale Glukoseinfusionsrate von NPL-Insulin und NPH-Insulin ist im Vergleich mit LM und MM gering (s. Tabelle

7). Die bei den Formulierungen von NPL- und NPH-Insulin registrierten niedrigen Werte für GIR_{max} und das späte Aktivitätsmaximum bei einigen Patienten bestätigen den basalen Charakter beider Verzögerungsinsuline. Die im Mittel beobachteten frühen Aktivitätsmaxima bei NPL- und NPH-Insulin müssen eher als Artefakte betrachtet werden, die durch die aus der Vorlaufphase der Versuche und unter 3.2 bereits beschriebenen Überhangeffekte induziert wurden, denn als eine wirklich rasch eintretende Stoffwechselwirkung der Verzögerungsinsuline.

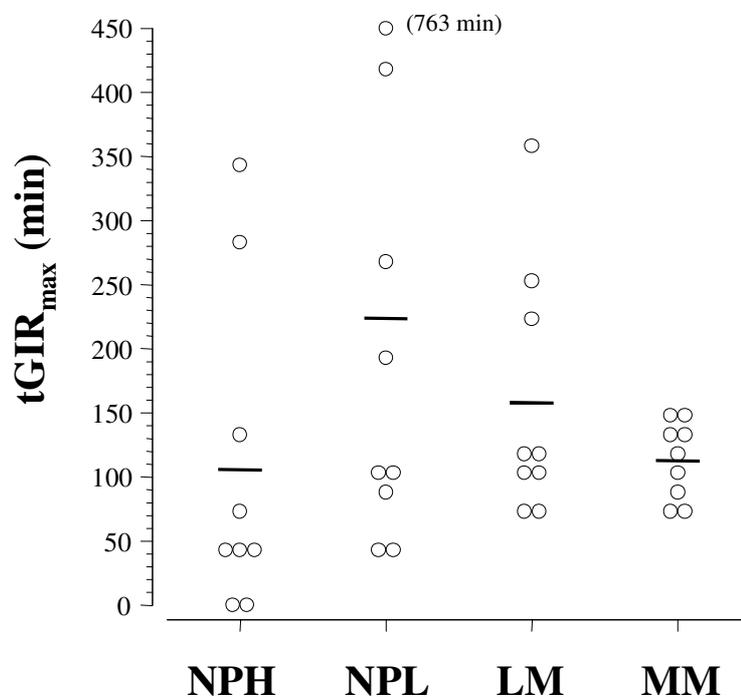
Abbildung 10 Korrelation von GIR_{max} mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro



Die offenen Kreise symbolisieren die individuellen Versuche, die ausgefüllten Kreise stellen die jeweiligen Mittelwerte, die Balken die Standardabweichung dar. Die verwendeten Daten wurden aus den 15-minütigen Mittelungsintervallen der GIR berechnet. Die Anzahl der Versuche beträgt 9. Die Linie stellt die lineare Regression der Mittelwerte dar.

In Abbildung 11 zeigen die $tGIR_{max}$ -Werte für LM und MM die erwartete, schnell einsetzende Wirkung von Insulin Lispro nach der s.c. Applikation mit einem raschen Maximum der Insulinwirkung. Für LM und MM lagen ca. 66% bzw. 100% der $tGIR_{max}$ -Werte innerhalb des zeitlichen Intervalls von 60 – 200 min nach s.c. Applikation. Die Ergebnisse für NPL- und NPH-Insulin weisen überraschende Unterschiede auf. Die maximale Insulinaktivität wurde zum Teil extrem früh (innerhalb von 60 min nach s.c. Applikation) oder sehr spät (nach 200 min oder später) beobachtet. Nur in 44% der Versuche mit NPL-Insulin und in 22% der Versuche mit NPH-Insulin wurde die maximale Insulinaktivität innerhalb des zeitlichen Intervalls von 60 bis 200 min gemessen.

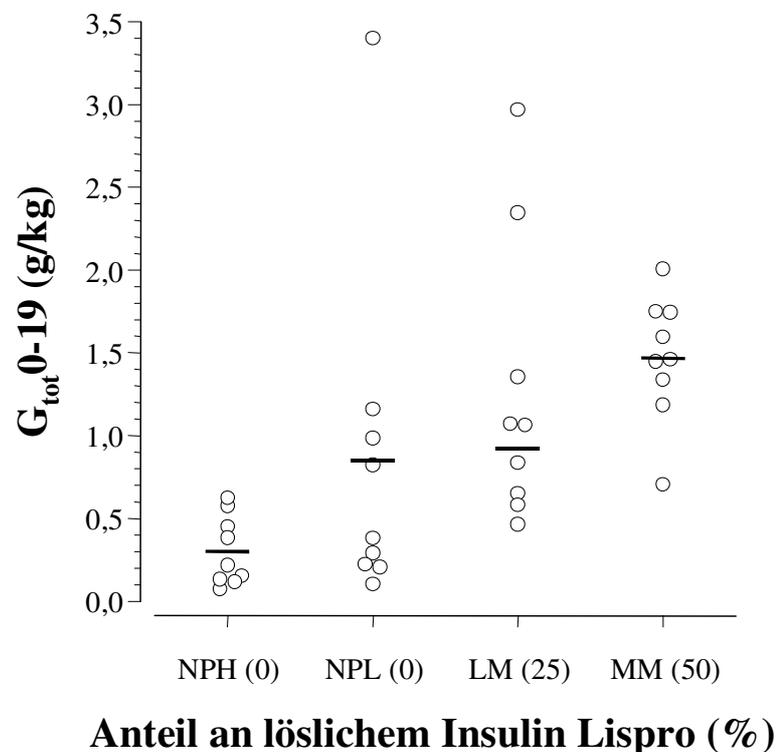
Abbildung 11 Vergleich der $tGIR_{max}$ -Werte



Die Kreise stellen die individuellen Versuche, die Balken das arithmetische Mittel dar. Die verwendeten Daten wurden aus den 15-minütigen Mittelungsintervallen der GIR berechnet. Die Anzahl der Versuche beläuft sich jeweils auf 9.

Die während der Versuche infundierte Gesamtmenge an Glukose ($G_{\text{tot}0-19}$) nimmt mit steigendem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro in den Formulierungen zu (s. Abbildung 12). Die deutliche Differenz zwischen der metabolischen Gesamtwirkung von NPH- und NPL-Insulin, deren Formulierungen beide kein lösliches Insulin Lispro enthalten, überrascht. Dieser vermeintlich deutliche Unterschied läßt sich aber mit dem in Abbildung 12 in der Meßreihe für NPL-Insulin aufgetretenen einzelnen „Ausreißer“ (3,4 g/kg) erklären. Das arithmetische Mittel der $G_{\text{tot}0-19}$ -Werte für NPL-Insulin würde sich ohne diesen einzelnen Wert von 0,85 g/kg auf 0,53 g/kg reduzieren und somit würde die Differenz zwischen NPH- und NPL-Insulin deutlich geringer ausfallen.

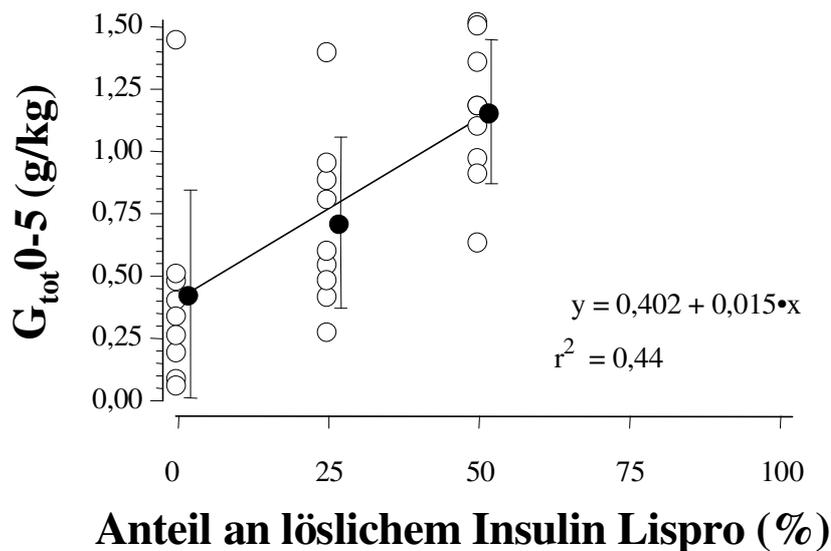
Abbildung 12 Vergleich der $G_{\text{tot}0-19}$ -Werte



Die Kreise stellen die individuellen Versuche, die Balken das arithmetische Mittel dar. Die verwendeten Daten wurden aus den 15-minütigen Mittelungsintervallen der GIR berechnet. Die Anzahl der Versuche beläuft sich jeweils auf 9.

In den ersten 8 h nach Applikation des jeweiligen Testinsulins blieb der Blutglukosespiegel bei den meisten Versuchen konstant. Die $G_{\text{tot}0-5}$ -Werte reflektieren am ehesten dieses frühe Intervall des Überwachungszeitraumes. Wie erwartet, ergab sich eine lineare und positive Korrelation zwischen den $G_{\text{tot}0-5}$ -Werten und dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro (s. Abbildung 13).

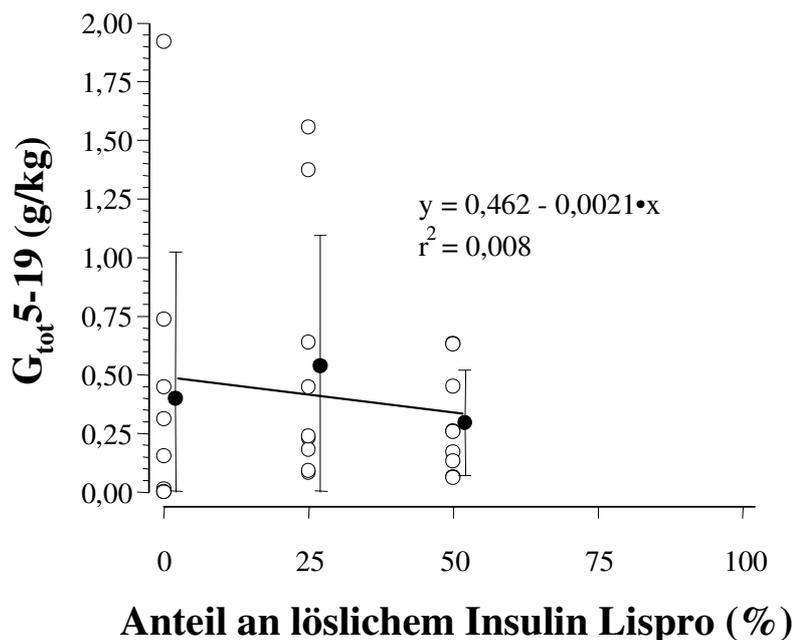
Abbildung 13 Korrelation der $G_{\text{tot}0-5}$ -Werte mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro



Die offenen Kreise stellen die individuellen Versuche, die ausgefüllten Kreise die jeweiligen Mittelwerte und die Balken die entsprechende Standardabweichung dar. Die verwendeten Daten wurden aus den 15-minütigen Mittelungsintervallen der GIR berechnet. Die Anzahl der Versuche beläuft sich jeweils auf 9. Die Linie stellt die lineare Regression der Mittelwerte dar.

Die Ergebnisse einer Studie mit gesunden Probanden (Heise [1998]) lassen für diese Studie ebenfalls eine negative monotone Korrelation zwischen dem löslichen Anteil an Insulin Lispro und den $G_{\text{tot}5-19}$ -Werten erwarten. Obwohl eine negative Relation vorhanden ist, ist die Korrelation sehr niedrig und kann von einer nichtexistenten Korrelation nicht eindeutig unterschieden werden (s. Abbildung 14).

Abbildung 14 Korrelation der $G_{\text{tot}5-19}$ -Werte mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro



Die offenen Kreise stellen die individuellen Versuche, die ausgefüllten Kreise die jeweiligen Mittelwerte und die Balken die entsprechende Standardabweichung dar. Die verwendeten Daten wurden aus den 15-minütigen Mittelungsintervallen der GIR berechnet. Die Anzahl der Versuche beläuft sich jeweils auf 9. Die Linie stellt die lineare Regression der Mittelwerte dar.

3.4 NPL-Insulin versus NPH-Insulin

Beim Vergleich von NPL- und NPH-Insulin wurden ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Glukodynamik und Pharmakokinetik erwartet. Sowohl NPL- als auch NPH-Insulin sind qualitativ ähnlich, d.h. beide weisen eine verzögerte Absorption auf und haben ähnliche Stoffwechselaktivitätsprofile mit den typischen Eigenschaften eines Verzögerungsinsulins [13].

Die GIR_{max} -Werte dieser Studie deuten auf eine geringfügig größere metabolische Reaktion der Probanden auf NPL-Insulin im Vergleich mit NPH-Insulin hin (s. Tabelle 7). Die $G_{tot0-19}$ -Werte für NPH-Insulin sind im Vergleich für NPL-Insulin signifikant erniedrigt. Sie liegen beide jedoch deutlich unter der Stoffwechselwirkung der bei dieser Studie verwendeten Mischinsulinformulierungen. Eine plausible Erklärung für die differierenden Ergebnisse von NPL- bzw. NPH-Insulin findet sich nicht. Einzig die geringe Anzahl an Studienteilnehmern und das Studiendesign, bei dem nicht alle Probanden die gleichen Insulinformulierungen erhielten, kann eventuell zur Erklärung der gefundenen Differenzen angeführt werden.

Die schlechte analytische Sensitivität bei der Bestimmungsmethode der FIRI-Konzentration und die daraus resultierende geringe Anzahl an verwertbaren Daten erlaubt keinen Vergleich der pharmakokinetischen Werte von NPL- mit NPH-Insulin.

3.5 Abhängigkeit der glukodynamischen Effekte vom Geschlecht

Die Anzahl an Patienten unterschiedlichen Geschlechts, die an dieser Studie teilnahmen, reichte nicht aus, um geschlechtsspezifische Unterschiede für die registrierten glukodynamischen Effekte erfassen zu können.

3.6 FIRI- und FIL-Konzentrationen

Die Messungen der FIRI-Konzentration nach Gabe von NPH-Insulin ergaben bei einem Großteil der Serumproben Werte unterhalb des Detektionslimits. Daher konnte nur bei 3 Patienten AUC-Werte für FIRI berechnet werden. Zusätzlich sind bei einigen Patienten meßbare FIRI-Konzentrationen nur direkt nach Applikation von NPH-Insulin nachweisbar. Diese als Freies Insulin gemessenen Werte können zirkulierendes Insulin aus der Versuchsvorlaufphase, der i.v. Insulininfusion und der i.v. Insulinboli, und somit fälschlich als NPH-Insulin in die Auswertung mit eingegangen sein. Daher müssen bei allen Aussagen zu pharmakokinetischen Eigenschaften von NPH-Insulin diese Tatsachen berücksichtigt werden. Aufgrund der geringen Menge an verwertbaren Daten konnten keine statistischen Analysen mit den pharmakokinetischen Daten von NPH-Insulin durchgeführt werden. In Tabelle 8 sind die

Mittelwerte der berechenbaren pharmakokinetischen Kenngrößen für LM, MM, NPL- und NPH-Insulin wiedergegeben. Die Werte für C_{\max} sind für MM am höchsten und nehmen in der Reihenfolge LM, NPH- und NPL-Insulin ab. Bei den FIRI- bzw. FIL-Werten von t_{\max} verläuft die Reihung NPL-Insulin>LM>MM>NPH-Insulin, wobei die frühen Werte für NPH-Insulin von 13 ± 10 min als Artefakt gewertet werden müssen (s.o.). Die FIL-AUC-Werte für AUC_{0-19} und AUC_{0-5} sind in der Reihenfolge der Insulin Lispro enthaltenden Formulierungen gleich: MM>LM >NPL-Insulin. Bei den AUC_{5-19} -Werten ist die Reihung für die FIL-Konzentration: LM>NPL-Insulin>MM. Die Summe der AUC_{0-5} - und der AUC_{5-19} -Werte entsprechen bei MM, LM und NPL-Insulin den jeweiligen AUC_{0-19} -Werten.

Tabelle 8 Pharmakokinetische Parameter der vier untersuchten Insulinformulierungen

Dosis (0,3 U/kg)

	LM ^{a, b}	MM ^a	NPL ^{a, c}	NPH ^d
C_{\max} (ng/ml)	$1,1 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,2$
t_{\max} (min)	83 ± 34	68 ± 23	165 ± 169	13 ± 10
AUC_{0-19} (ng•h/ml)	$4,2 \pm 2,2$	$4,3 \pm 1,6$	$2,0 \pm 1,9$	f
AUC_{0-5} (ng•h/ml)	$1,2 \pm 0,6$	$3,4 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,5$	f
AUC_{5-19} (ng•h/ml)	$3,0 \pm 1,7$	$0,9 \pm 0,8$	$1,1 \pm 1,5$	f

^a Konzentrationsmessungen für FIL

^b Anzahl N = 8 für C_{\max} , t_{\max} und FIL-AUC-Werte

^c Anzahl N = 7 für C_{\max} - und t_{\max} -Werte; N = 6 für FIL-AUC-Werte

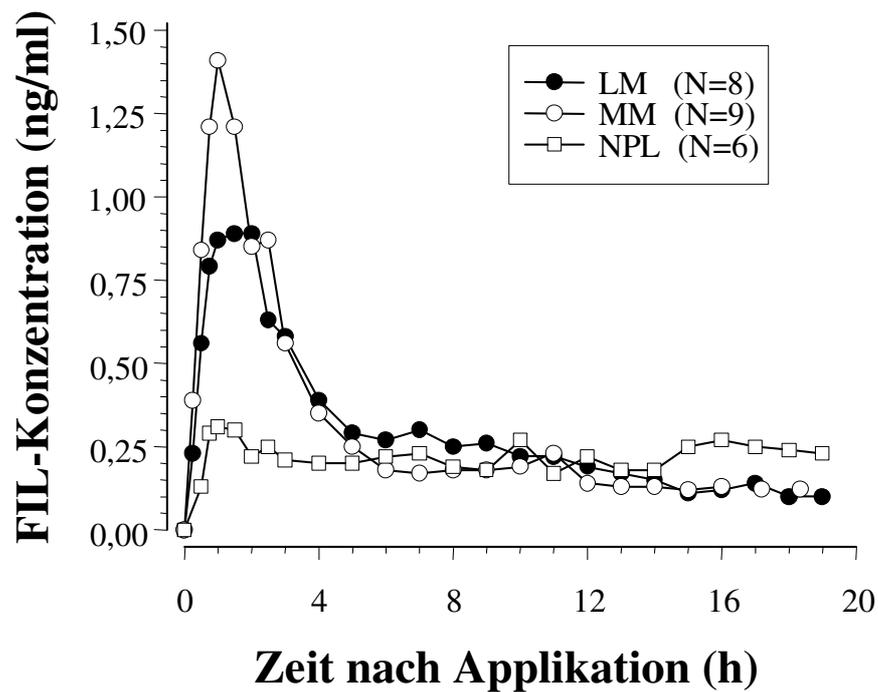
^d Konzentrationsmessungen für FIRI

f Zu wenig verwertbare Daten

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

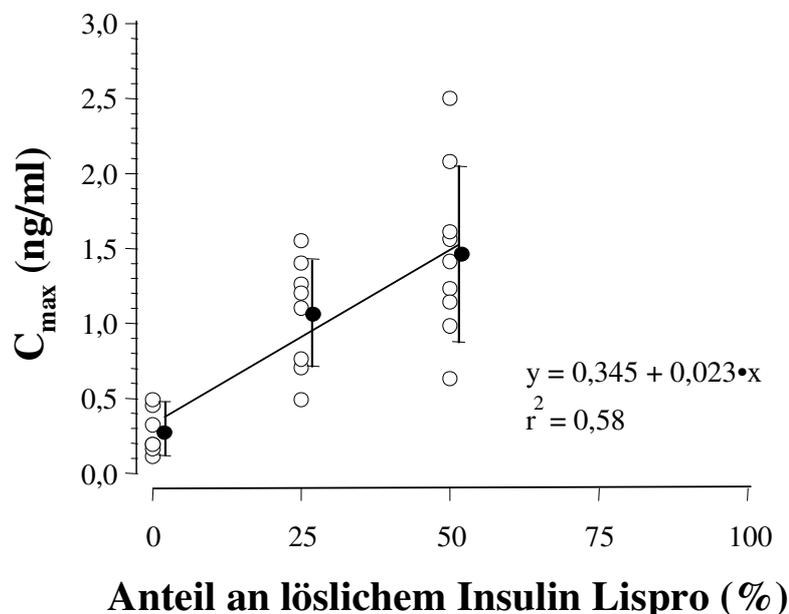
Die in Abbildung 15 dargestellten Mittelwerte der FIL-Konzentrationen für LM, MM und NPL-Insulin zeigen bei LM und MM einen raschen Anstieg der FIL-Serumkonzentration. Dieser rasche Peak wird durch die schnelle Absorption von Insulin Lispro verursacht und reflektiert die Präsenz an löslichem Insulin Lispro in den Formulierungen. Der flachere Verlauf der FIL-Konzentrationskurve bei NPL-Insulin entspricht dem eines Verzögerungsinsulins.

Abbildung 15 FIL-Serumkonzentrationen bei LM, MM und NPL-Insulin



Die maximale Insulinkonzentration zeigt eine lineare Korrelation mit erwartungsgemäß höheren C_{\max} -Werten bei steigendem Anteil an löslichem Insulin Lispro (s. Abbildung 16).

Abbildung 16 Korrelation der C_{\max} -Werte mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro

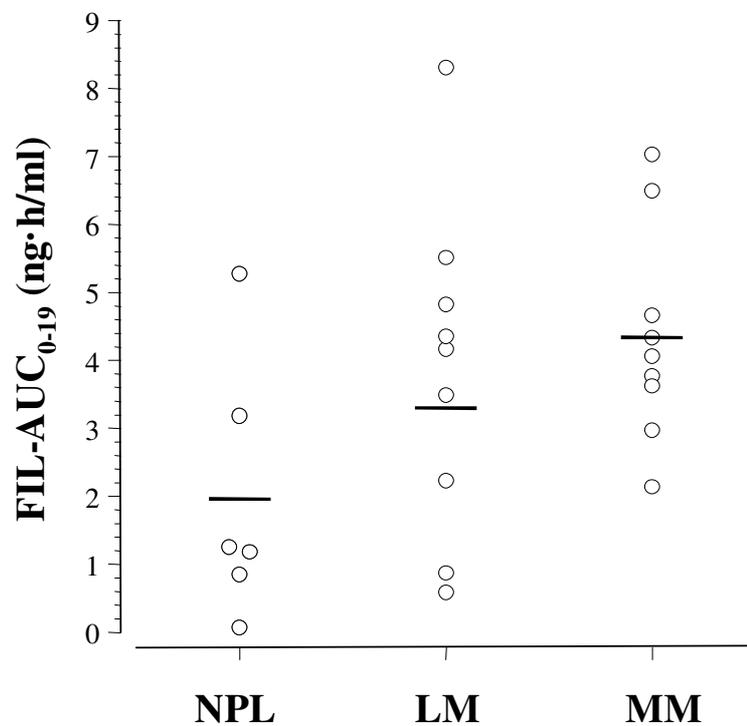


Die offenen Kreise stellen die jeweiligen individuellen Versuchsergebnisse, die ausgefüllten Kreise das arithmetische Mittel und die Balken die Standardabweichung dar. Die Linie stellt die lineare Regression der Mittelwerte dar.

Bei der Betrachtung der in Abbildung 17 dargestellten mittleren t_{\max} -Werte aller verwendeten Insulinformulierungen werden die extrem frühen Werte von 13 ± 10 min für NPH-Insulin (s. Tabelle 8) als Artefakt betrachtet. Diese rasch erreichten maximalen Insulinkonzentrationen lassen sich nur durch die bereits erwähnten aus der Versuchsvorlaufphase stammenden Überhangeffekte erklären. Aus diesem Grund können die Werte von t_{\max} für NPH-Insulin bei dem Vergleich der Insulinformulierungen nicht berücksichtigt werden. Sie sind nur der Vollständigkeit halber in Abbildung 17 wiedergegeben. Auch die Werte für NPL-Insulin zeigen mit Ausnahme von einem Ausreißer rasche maximale Insulinkonzentrationen mit Werten zwischen 50 – 150 min. Diese für ein Verzögerungsinsulin eher überraschenden Ergebnisse müssen ebenso unter dem Aspekt der aus der Versuchsvorlaufphase stammenden Überhangeffekte betrachtet werden.

Die FIRI- bzw. FIL-AUC-Werte stellen den während des jeweiligen Intervalls gemessenen prozentualen Anteil am Gesamtinsulin dar. Der Vergleich der AUC_{0-19} -Berechnungen für FIL zeigt keine ausgeprägten Unterschiede zwischen LM und MM. Obwohl bei allen Versuchen die Probanden jeweils 0,3 U des jeweiligen Insulins pro Kilogramm Körpergewicht injiziert bekamen, zeigen sich deutlich niedrigere AUC_{0-19} -Werte bei den Versuchen mit NPL-Insulin (s. Tabelle 8 und Abbildung 18). Die Gründe für die niedrigeren FIL- AUC_{0-19} -Werte für NPL-Insulin sind unklar.

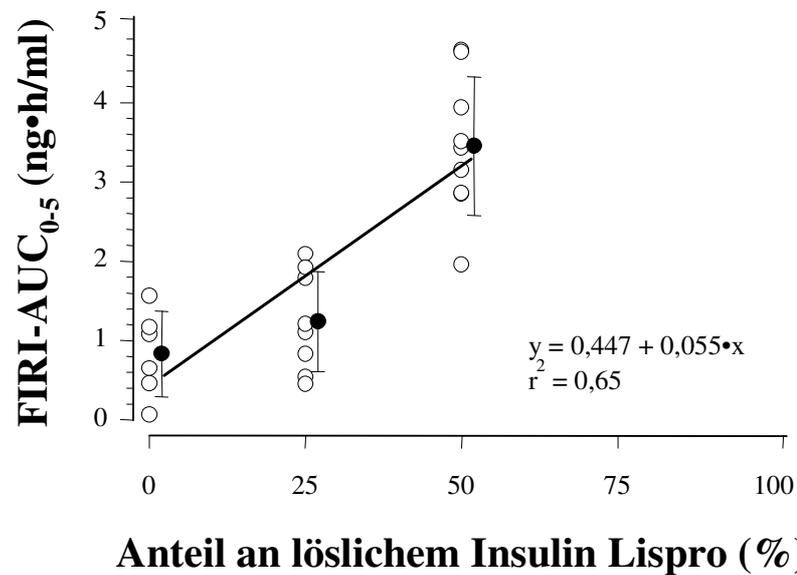
Abbildung 18 Vergleich der FIL- AUC_{0-19} -Werte von LM, MM und NPL-Insulin



Die offenen Kreise stellen die jeweiligen individuellen Versuchsergebnisse, die Balken das arithmetische Mittel dar.

Die berechneten FIRI-AUC₀₋₅-Werte korrelieren mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro bei den Versuchen mit LM, MM und NPL-Insulin. Abbildung 19 zeigt diese positiv lineare Korrelation in Form einer Regressionsgeraden. Die dargestellte Korrelation korrespondiert mit der in Abbildung 13 erkennbaren Korrelation zwischen den G_{tot}0-5-Werten und dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro.

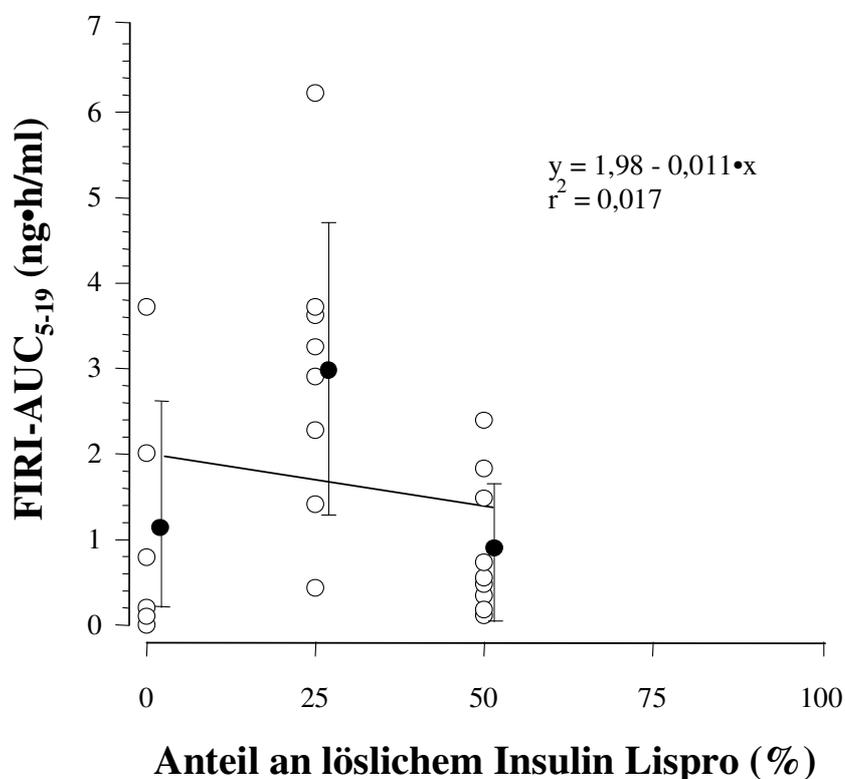
Abbildung 19 Korrelation der FIRI-AUC₀₋₅-Werte mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro



Die offenen Kreise stellen die jeweiligen individuellen Versuchsergebnisse, die ausgefüllten Kreise das arithmetische Mittel und die Balken die Standardabweichung dar. Die Linie stellt die lineare Regression der Mittelwerte dar.

Zwischen den FIRI-AUC₅₋₁₉-Werten und dem löslichen Anteil an Insulin Lispro wurde vergleichbar den G_{tot}5-19-Werten aufgrund des in diesem Intervall abnehmenden Anteils an löslichem Insulin Lispro eine geringfügig negative Korrelation erwartet. Die in Abbildung 20 dargestellte Korrelation zeigt eine so geringe negative Steigung, daß man von einer eindeutigen Korrelation nicht sprechen kann. Die gemessenen niedrigen NPL-Insulin-Konzentrationen, die häufig unterhalb des Detektionslimits lagen, tragen zu diesem nicht interpretierbaren Ergebnis mit bei.

Abbildung 20 Korrelation der FIRI-AUC₅₋₁₉-Werte mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro



Die offenen Kreise stellen die jeweiligen individuellen Versuchsergebnisse, die ausgefüllten Kreise das arithmetische Mittel und die Balken die Standardabweichung dar. Die Linie stellt die lineare Regression der Mittelwerte dar.

3.7 Insulinantikörper

Der Referenzbereich für die Antikörperbindung beträgt für kreuzreaktive Antikörper 0% bis 1,6%, für Insulin Lispro-spezifische Antikörper 0% bis 0,9% und 0% bis

0,8% für Humaninsulin-spezifische Antikörper. Tabelle 9, 10 und 11 fassen die Ergebnisse der kreuzreaktiven, Insulin Lispro-spezifischen und Humaninsulin-spezifischen Antikörpermessungen zusammen.

Alle Patienten weisen mindestens einen Wert für kreuzreaktive Antikörper außerhalb des Referenzbereiches auf. Der Mittelwert der kreuzreaktiven Antikörperbestimmung beträgt für alle drei Versuchstage 3,7% mit einem Minimum von 1,2% und einem Maximum von 21,5%. Die Patienten Nr. 2, 6 und 9 zeigen Werte oberhalb von 10%. Bei dem Nachweis für Insulin Lispro-spezifische Antikörper lagen nur die Patienten Nr. 2 mit einem Wert von 1,8% und Nr. 3 mit einem Wert von 1,0% knapp außerhalb des Referenzbereiches. Für die restlichen Patienten ergab das arithmetische Mittel der Insulin Lispro-spezifischen Antikörperbestimmung für alle drei Tage 0,3%. Bei der Bestimmung der Humaninsulin-spezifischen Antikörper zeigen 5 der 12 Patienten Werte außerhalb des Referenzbereiches. Das arithmetische Mittel der Humaninsulin-spezifischen Antikörper aller Patienten für die drei Versuchstage beträgt 0,5% mit einem Minimum von 0% und einem Maximum von 1,3%.

Tabelle 9 Ergebnisse der kreuzreaktiven Antikörperbestimmung

Patienten-Nr.	Visite 2 Messung (%)	Visite 3 Messung (%)	Visite 4 Messung (%)	Intervall zwischen Visite 2 und 4 (Tage)
1	1,6	1,7	1,6	28
2	21,5	19,5	19,5	17
3	5,3	1,3	4,3	14
4	5,4	5,6	5,9	24
6	6,3	10,3	10,6	20
7	3,1	2,7	2,5	20
8	1,4	1,9	1,7	22
9	11,5	11,8	11,4	14
10	3,2	2,9	3,1	31
11	1,8	1,5	1,2	14
12	4,5	4,3	7,2	17
13	3,2	3,8	3,9	15
Minimum	1,4	1,3	1,2	14
Maximum	21,5	19,5	19,5	28
Arithmetisches Mittel	5,7	5,6	6,1	19,7
Median	3,9	3,4	4,1	18,5

Tabelle 10 Ergebnisse der Insulin Lispro-spezifischen Antikörperbestimmung

Patienten-Nr.	Visite 2 Messung (%)	Visite 3 Messung (%)	Visite 4 Messung (%)	Intervall zwischen Visite 2 und 4 (Tage)
1	0,8	0,4	0,2	28
2	0,6	0,8	1,8	17
3	0,4	0,2	1,0	14
4	0,6	0,4	0,3	24
6	0,5	0,0	0,0	20
7	0,7	0,5	0,1	20
8	0,2	0,0	0,4	22
9	0,5	0,2	0,3	14
10	0,8	0,3	0,0	31
11	0,1	0,5	0,5	14
12	0,2	0,2	0,4	17
13	0,4	0,0	0,0	15
Minimum	0,1	0,0	0,0	14
Maximum	0,8	0,8	1,8	31
Arithmetisches Mittel	0,5	0,3	0,4	19,7
Median	0,5	0,3	0,3	18,5

Tabelle 11 Ergebnisse der Humaninsulin-spezifischen Antikörperbestimmung

Patienten-Nr.	Visite 2 Messung (%)	Visite 3 Messung (%)	Visite 4 Messung (%)	Intervall zwischen Visite 2 und 4 (Tage)
1	1,0	0,8	0,8	28
2	0,7	0,5	0,8	17
3	0,5	0,0	0,4	14
4	0,8	0,9	0,4	24
6	0,9	0,0	0,4	20
7	0,9	0,5	0,4	20
8	0,4	0,6	0,3	22
9	1,1	0,5	1,3	14
10	0,4	0,4	0,0	31
11	0,3	0,0	0,0	14
12	0,0	0,0	0,5	17
13	0,3	0,1	0,2	15
Minimum	0,0	0,0	0,0	14
Maximum	1,1	0,9	1,3	31
Arithmetisches Mittel	0,6	0,4	0,5	19,7
Median	0,6	0,5	0,4	18,5

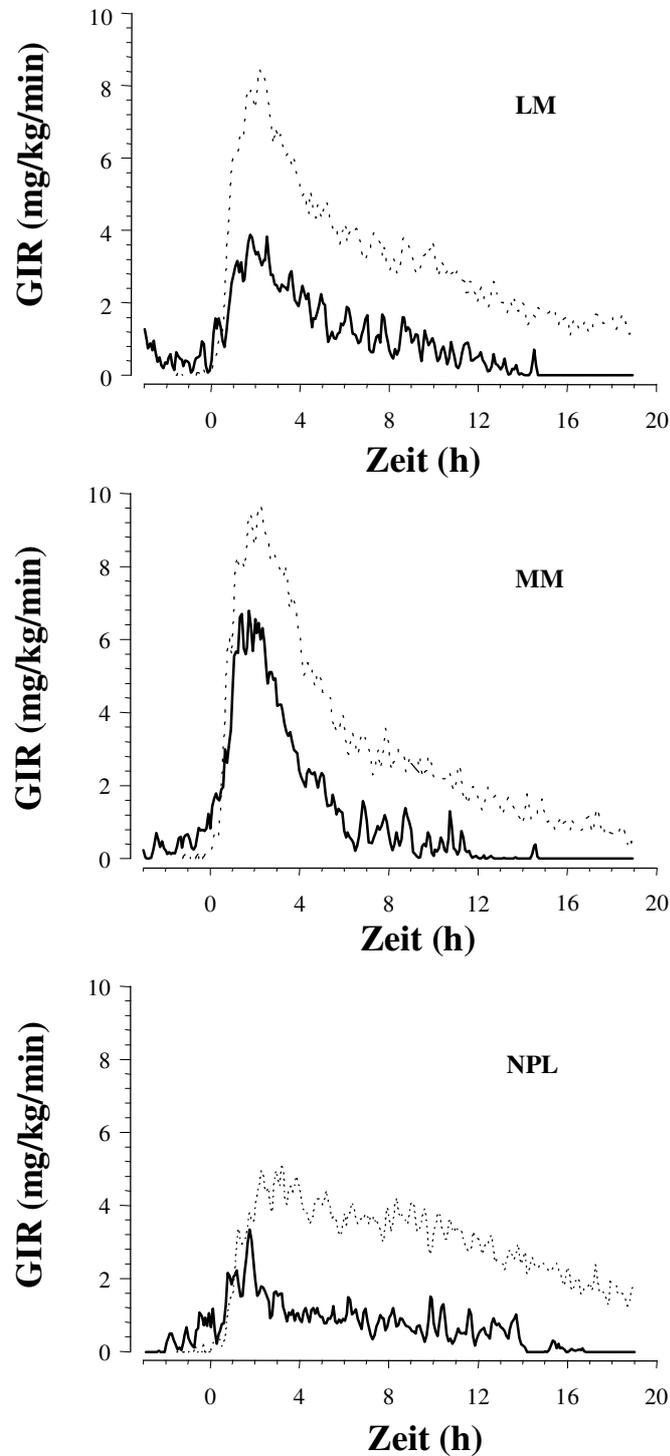
4 Vergleich mit gesunden Probanden

Die bei dieser Studie für LM, MM und NPL-Insulin bei Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus ermittelten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Kenngrößen können mit den Ergebnissen einer Studie mit gesunden Probanden (Heise [1998]) verglichen werden. Obwohl sich beide Studien im Studiendesign, der Anzahl der partizipierenden Teilnehmer und der differierenden Kontrolle der Blutglukosekonzentration bei Gesunden und Patienten unterscheiden, wurde dieser Vergleich durchgeführt, um die prognostischen Aussagen der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Ergebnisse einer Studie mit gesunden Probanden für diese Studie mit Patienten mit IDDM abschätzen zu können.

4.1 Pharmakodynamik

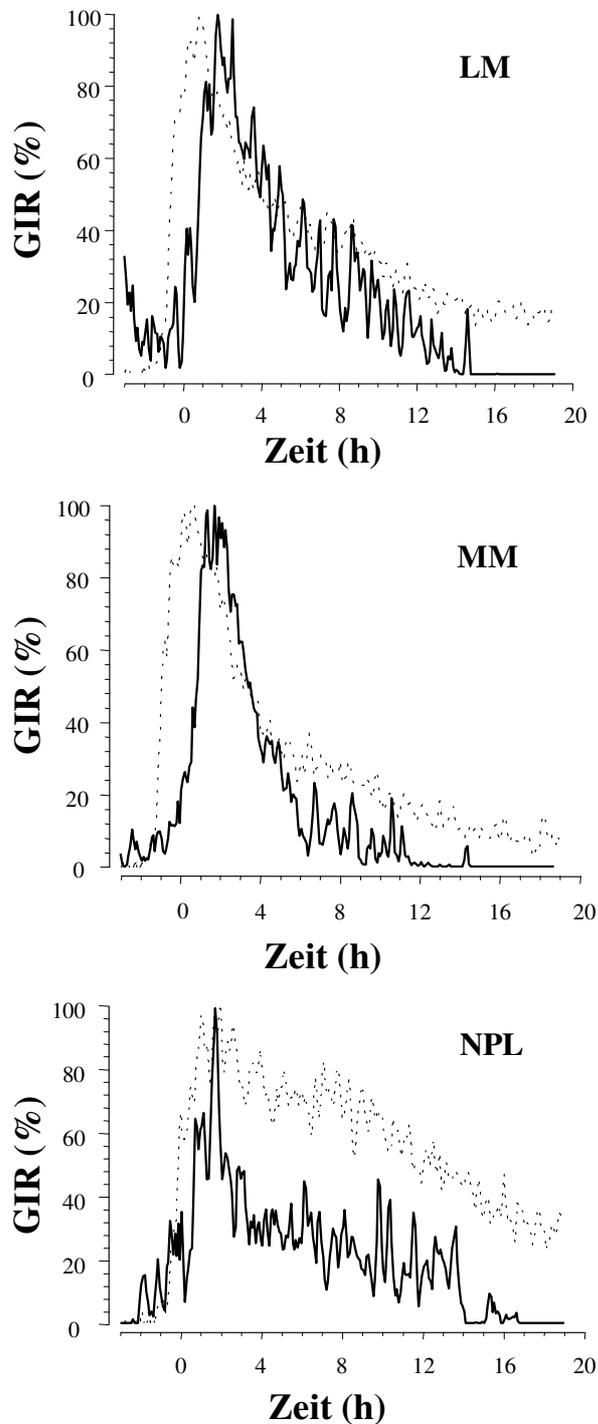
Der Vergleich der GIR zwischen Patienten mit Diabetes mellitus und gesunden Probanden zeigt deutlich höhere absolute GIR-Werte bei den Gesunden (s. Abbildung 21). Eine Normierung der GIR-Werte auf 100% (Dadurch entfallen die Unterschiede der Absolutwerte) zeigt allerdings, daß die eigentlichen Verläufe der GIR-Profile bei Gesunden und Patienten nahezu identisch sind (s. Abbildung 22). Dies deutet daraufhin, daß das „relative“ Wirkprofil beider Insulinformulierungen sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit Diabetes mellitus vergleichbare Verläufe aufweist. Zwischen beiden Kollektiven ist aber die absolute Menge an utilisierter Glukose unterschiedlich. Dies deutet auf eine Insulinresistenz bei den Patienten mit Diabetes mellitus hin.

Abbildung 21 Vergleich der mittleren Glukoseinfusionsraten von gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen in zwei unterschiedlichen Studien



Die gepunktete Linie stellt die mittleren GIR-Profile der gesunden Probanden [16], die durchgezogene die angepassten Werte der Patienten mit Diabetes mellitus dar. Die Anzahl der gesunden Probanden betrug 30, die Anzahl der in dieser Studie untersuchten Diabetiker betrug pro getestetem Insulin 9. Der Zeitpunkt der Insulinapplikation lag bei $t = 0$ h.

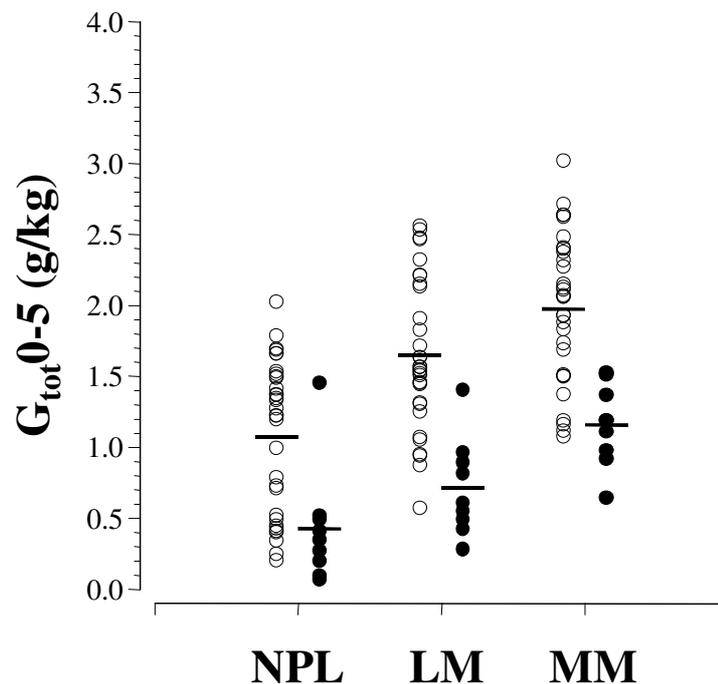
Abbildung 22 Prozentualer Vergleich der mittleren Glukoseinfusionsraten bei gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen in zwei unterschiedlichen Studien



Die gepunktete Linie stellt die mittleren GIR-Profile der gesunden Probanden [16], die durchgezogene die angepaßten Werte der Patienten mit Diabetes mellitus dar. Die Anzahl der gesunden Probanden betrug 30, die Anzahl der in dieser Studie untersuchten Diabetiker betrug pro getestetem Insulin 9. Der Zeitpunkt der Insulinapplikation lag bei $t = 0$ h.

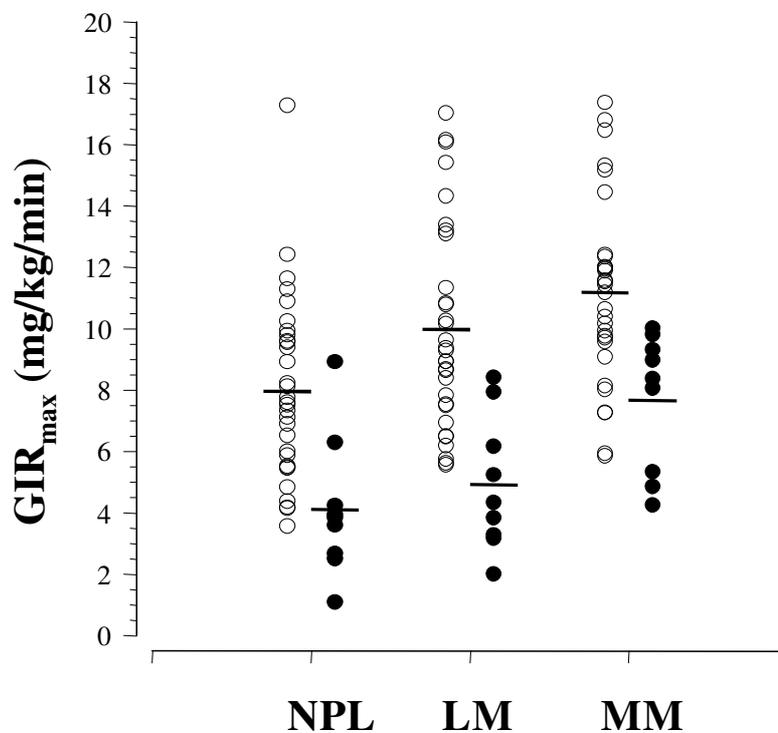
Da bei beiden Studien die gleiche Dosis von subkutan injiziertem Testinsulin von 0,3 U/kg verwendet wurde, liefert dies keine Erklärung für die massiven Differenzen bei den Werten für $G_{\text{tot}0-5}$ und GIR_{max} (s. Abbildung 23 und 24). Weiterhin war die Blutglukosekonzentration der Patienten mit Diabetes für $G_{\text{tot}0-5}$ in dem zeitlichen Intervall von 5 h nach Injektion des jeweiligen Testinsulins noch innerhalb des Startwertes von 90 ± 10 mg /dl (s. Tabelle 6) und somit vergleichbar mit den Werten der gesunden Probanden. Eine Erklärung für die beobachtete Differenz bei den Werten für $G_{\text{tot}0-5}$ und GIR_{max} zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus können die unterschiedlich hohen Seruminsulinkonzentrationen sein (s. Abbildung 26). Diese können in Anbetracht der verwendeten gleichen Insulindosierung bei beiden Studien auch durch Unterschiede bei den verwendeten Bestimmungsmethoden der Insulinkonzentration erklärt werden (s. 4.2).

Abbildung 23 Vergleich von $G_{\text{tot}0-5}$ bei gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen bei zwei unterschiedlichen Studien



Die offenen Kreise stellen die Ergebnisse der individuellen Versuche der gesunden Probanden [16], die ausgefüllten Kreise die der Versuche der Patienten mit Diabetes mellitus und die Balken das jeweilige arithmetische Mittel dar.

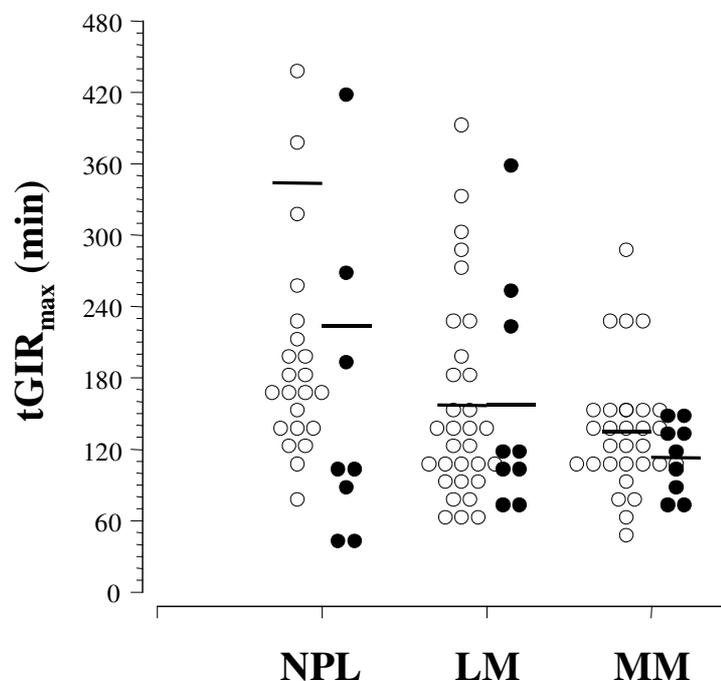
Abbildung 24 Vergleich von GIR_{max} bei gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen in zwei unterschiedlichen Studien



Die offenen Kreise stellen die Ergebnisse der individuellen Versuche der gesunden Probanden [16], die ausgefüllten Kreise die der Versuche der Patienten mit Diabetes mellitus und die Balken das jeweilige arithmetische Mittel dar.

Für LM und MM ergibt, wie erwartet, der Vergleich kaum Unterschiede zwischen den $tGIR_{max}$ -Werten (s. Abbildung 25). Bei den Versuchen mit NPL-Insulin wurde bei den Patienten mit Diabetes mellitus deutlich frühere $tGIR_{max}$ -Werte beobachtet. Dies ist sehr wahrscheinlich durch das auf den Stoffwechsel der Patienten wirkende, aus der Vorlaufphase der Versuche stammende „non-Studieninsulin“ (s. 2.7), zu erklären. Ebenso könnte dieser Artefakt die Erklärung für den in Abbildung 21 und 22 beobachteten deutlichen Peak bei den Versuchen der Patienten mit Diabetes mellitus mit NPL-Insulin sein.

Abbildung 25 Vergleich von $tGIR_{max}$ bei gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen in zwei unterschiedlichen Studien



Die offenen Kreise stellen die Ergebnisse der individuellen Versuche der gesunden Probanden [16], die ausgefüllten Kreise die der Versuche der Patienten mit Diabetes mellitus und die Balken das jeweilige arithmetische Mittel dar. 9 Werte bei den Versuchen gesunder Probanden mit NPL-Insulin lagen außerhalb des Skalierungsbereiches der Graphik.

4.2 Pharmakokinetik

Wie zu erwarten, zeigt die Studie mit Patienten mit Diabetes mellitus für C_{\max} , t_{\max} und die FIL-Werte der AUC_{0-5} ähnliche Ergebnisse, wie die Studie bei gesunden Probanden. Dabei ist die Reihenfolge MM>LM>NPL-Insulin für C_{\max} , NPL-Insulin >LM>MM für t_{\max} und MM>LM>NPL-Insulin für AUC_{0-5} . Die FIL-Werte von AUC_{0-19} sind für LM und MM nahezu identisch, aber für NPL-Insulin niedriger. Der Vergleich mit den Daten der Studie mit gesunden Probanden ergibt für alle pharmakokinetischen Parameter prozentual gesehen die gleiche Reihung (s. Tabelle 12).

Tabelle 12 Prozentualer Vergleich pharmakokinetischer Parameter von gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen in zwei unterschiedlichen Studien

Parameter		MM	LM	NPL
C_{\max} (%)	Patienten	100	74	20
	Probanden	100	53	33
t_{\max} (%)	Patienten	42	51	100
	Probanden	40	47	100
FIL- AUC_{0-5} (%)	Patienten	100	37	25
IRI- AUC_{0-6} (%)	Probanden	100	62	30
AUC_{0-19} (%)	Patienten	100	98	47
	Probanden	100	76	61

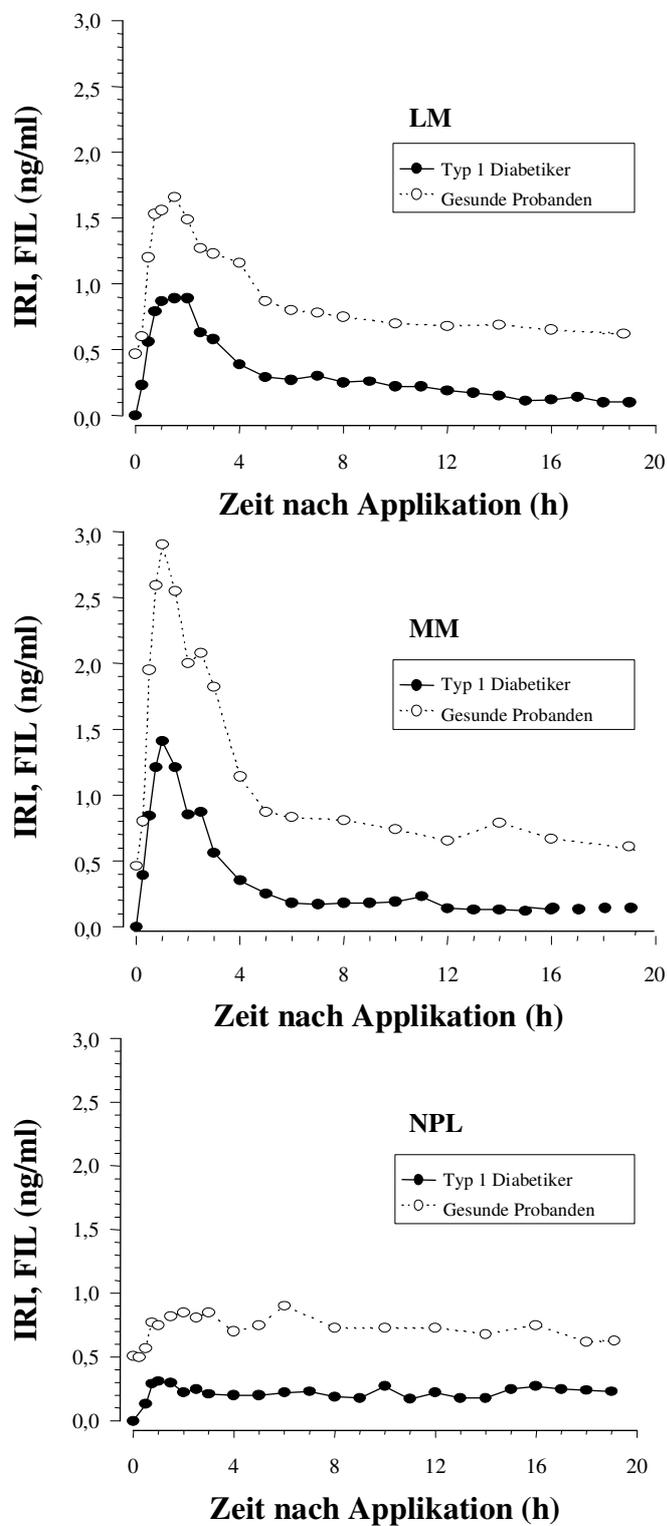
Die jeweiligen maximalen absoluten Werte der aufgeführten pharmakokinetischen Parameter wurden gleich 100 Prozent gesetzt. Die AUC_{0-19} -Werte wurden bei den gesunden Probanden für IRI, bei den Patienten mit Diabetes mellitus für FIL berechnet.

Der Vergleich der pharmakokinetischen Profile der Freien Insulin Lispro-Konzentration von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und der Immunreaktiven Insulinkonzentration gesunder Probanden zeigt bei den gesunden Probanden höhere Insulinkonzentrationen nach Applikation von LM, MM und NPL-Insulin (s. Abbildung 26). Da bei beiden Studien zwei unterschiedliche Nachweismethoden zur Bestimmung des im Blut zirkulierenden Insulins verwendet wurden, stellt dies eine plausible Erklärung für diesen Befund dar (s. 4.1).

Bei der Studie mit gesunden Probanden (Heise [1998]) wurde ein unspezifischer Assay benutzt, der eine 100%ige Kreuzreaktivität zwischen Insulin und Insulin Lispro aufweist. Dies führt dazu, daß der Assay zusätzlich zu dem Insulin Lispro auch das endogen produzierte Insulin der gesunden Probanden mitbestimmt hat. Der bei der vorliegenden Studie verwendete, für Insulin Lispro spezifische, Assay bestimmt im Unterschied dazu nur dieses (s. 2.9.2). Der Unterschied in der Spezifität der Bestimmungsmethoden kann nicht beweisend, aber erklärend für die in Abbildung 26 dargestellten Differenzen der Insulinkonzentrationen angeführt werden.

Der parallele Kurvenverlauf der Insulinkonzentrationen bei gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus ist ein Hinweis dafür, daß bei beiden Probandengruppen die untersuchten Insulinformulierungen vergleichbare pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen.

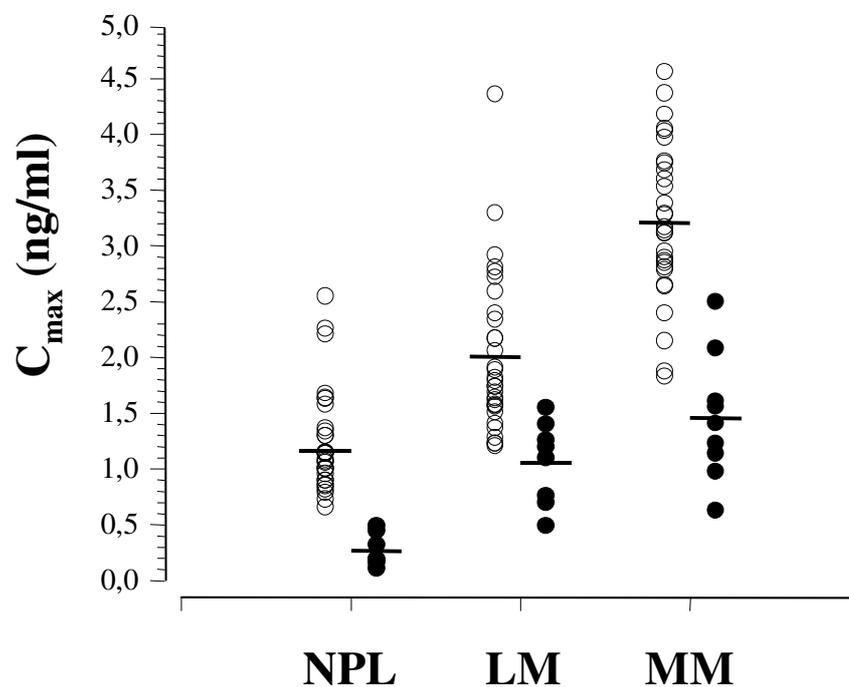
Abbildung 26 Vergleich der IRI- und FIL-Konzentrationen von gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen in zwei unterschiedlichen Studien



Die offenen Kreise stellen die Ergebnisse der individuellen Versuche der gesunden Probanden [16], die ausgefüllten Kreise die der Versuche der Patienten mit Diabetes mellitus und die Balken das jeweilige arithmetische Mittel dar.

Es wurden Vergleiche der C_{\max} und $FIL-AUC_{0-5}$ -Werte für LM, MM und NPL-Insulin zwischen gesunden Probanden und Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen sowohl den Trend zu ansteigenden Seruminsulinkonzentrationen mit zunehmendem Anteil an löslichem Insulin Lispro in den verschiedenen Formulierungen als auch die höheren Insulin Lispro-Konzentrationen bei gesunden Probanden (s. Abbildung 27 und 28).

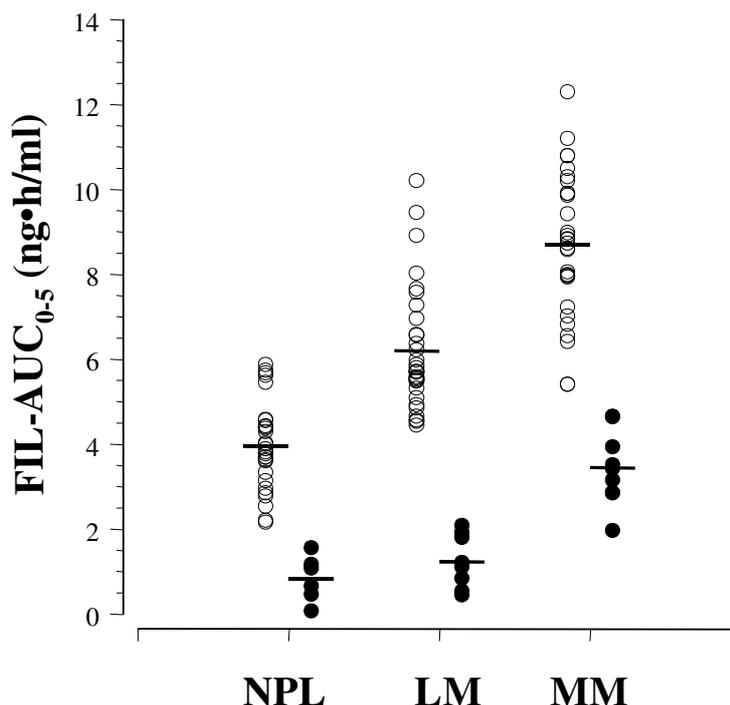
Abbildung 27 Vergleich der C_{\max} -Werte von gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen in zwei unterschiedlichen Studien



Die offenen Kreise stellen die Ergebnisse der individuellen Versuche der gesunden Probanden [16], die ausgefüllten Kreise die der Versuche der Patienten mit Diabetes mellitus und die Balken das jeweilige arithmetische Mittel dar.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, weisen entsprechend den höheren maximalen Insulinkonzentrationen (C_{\max}) aus Abbildung 27 die FIL-AUC₀₋₅-Werte der gesunden Probanden im Vergleich mit denen der Patienten mit Diabetes mellitus höhere absolute Werte auf.

Abbildung 28 Vergleich der FIL-AUC₀₋₅-Werte von gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei s.c. Applikation der gleichen Insulinformulierungen in zwei unterschiedlichen Studien



Die offenen Kreise stellen die Ergebnisse der individuellen Versuche der gesunden Probanden [16], die ausgefüllten Kreise die der Versuche der Patienten mit Diabetes mellitus und die Balken das jeweilige arithmetische Mittel dar.

4.3 Korrelation der Ergebnisse beider Studien

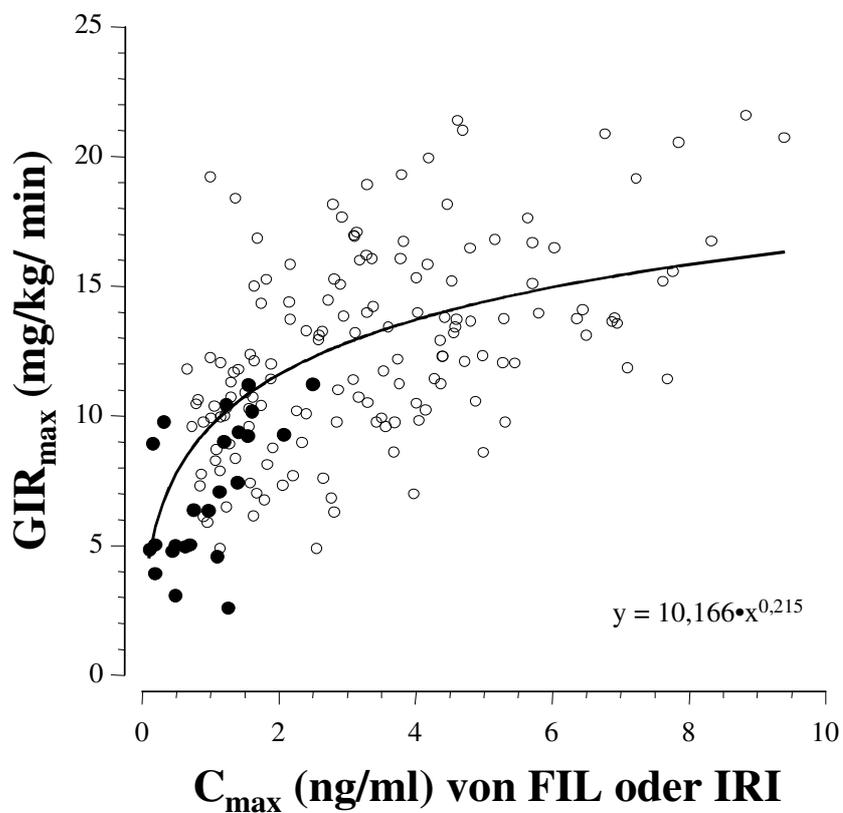
Die Verknüpfung zwischen der Pharmakokinetik und Glukodynamik der Formulierungen LM, MM und NPL-Insulin wurde bereits in einer früheren Studie (Heise [1998]) mit gesunden Probanden dokumentiert und in der vorliegenden Studie bestätigt. Es zeigte sich, daß bei der Studie mit Patienten pharmakokinetische und glukodynamische Parameter wie C_{\max} und GIR_{\max} eine nicht proportionale Korrelation aufweisen. Das bedeutet, daß bei einer Verdoppelung der Seruminsulinkonzentration (in diesem Fall die C_{\max} -Werte) der dazu passende glukodynamische Para-

meter (GIR_{max}) zwar ansteigt, aber nicht direkt proportional. Im Gegenteil, der prozentuale Anteil der Zunahme der metabolischen Wirkung nimmt mit steigender Seruminsulinkonzentration ab.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind allerdings aufgrund der geringen Stichprobengröße und der mehrfach beschriebenen Problematik aus der Versuchsvorlaufphase nur in einem limitierten Bereich der Pharmakokinetik und Glukodynamik mit den Ergebnissen der Studie mit gesunden Probanden vergleichbar. Es wurde trotzdem der Versuch unternommen, die Ergebnisse dieser Studie mit Patienten mit Diabetes mellitus vergleichend mit den Daten der Studie mit gesunden Probanden zu interpretieren.

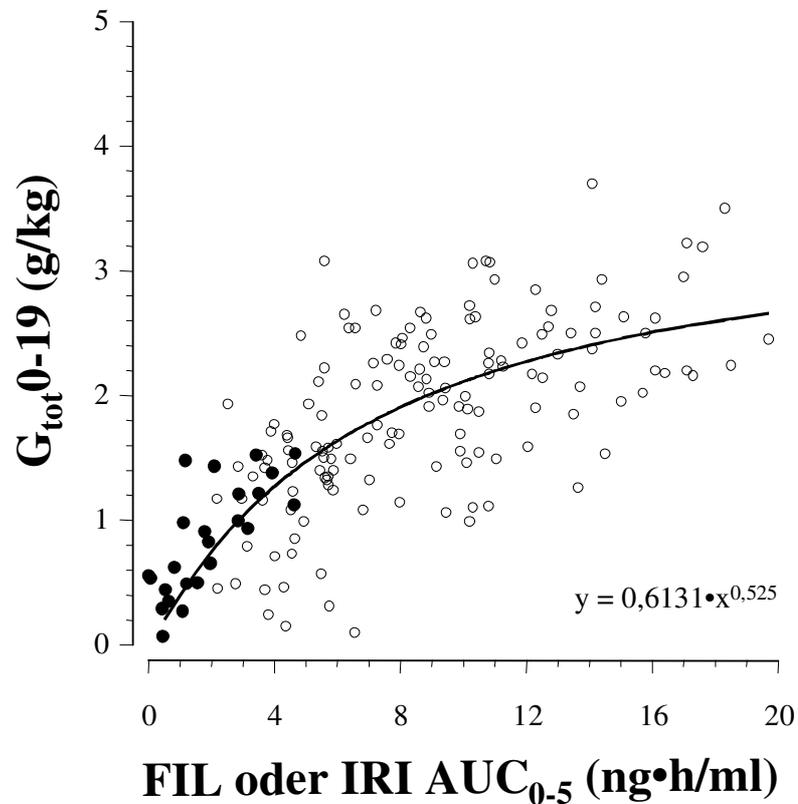
Das bei der Studie mit gesunden Probanden ermittelte nicht-lineare Modell zur Beschreibung der Korrelation von C_{max}/GIR_{max} und $FIRI-AUC_{0-5}/G_{tot5-19}$ wurde genutzt, um die Ergebnisse der vorliegenden Studie vorherzusagen. Abbildung 29 und 30 zeigen die Ergebnisse des mit den Daten gesunder Probanden erstellten nicht-linearen Modells mit den integrierten Daten der Patienten mit Diabetes mellitus. Die Werte der Patienten mit Diabetes mellitus gruppieren sich um das niedrigere Ende des nicht-linearen Modells, sowohl für die Korrelation der pharmakodynamischen Werte von C_{max}/GIR_{max} , als auch für die Korrelation der pharmakokinetischen Daten von $FIRI-AUC_{0-5}/G_{tot5-19}$.

Abbildung 29 Integration der C_{\max} - und GIR_{\max} -Werte von Patienten mit Diabetes mellitus in die Korrelation gesunder Probanden



Die offenen Kreise stellen die individuellen Ergebnisse der Versuche der gesunden Probanden [16], die ausgefüllten Kreise die der Diabetiker dar. Die Kurve zeigt das nicht-lineare Modell für die Daten der Studie mit gesunden Probanden.

Abbildung 30 Integration der AUC_{0-5} - und $G_{tot0-19}$ -Werte von Patienten mit Diabetes mellitus in die Korrelation gesunder Probanden



Die offenen Kreise stellen die individuellen Ergebnisse der Versuche der gesunden Probanden [16], die ausgefüllten Kreise die der Diabetiker dar. Die Kurve zeigt das nicht-lineare Modell für die Daten der Studie mit gesunden Probanden.

Die beiden Graphiken zeigen, daß sich die Ergebnisse der Studie mit Patienten mit Diabetes mellitus im vorhersagbaren Bereich des nicht-linearen Modells der Studie mit gesunden Probanden befinden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Glukose-Clamp-Studien mit gesunden Probanden genutzt werden können, um die auftretenden Stoffwechselwirkungen von Insulinformulierungen bei Patienten mit Diabetes mellitus im voraus abzuschätzen.

5 Diskussion

Das Ziel dieser klinisch-experimentellen Studie war es, die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von LM, MM und NPL-Insulin bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 zu bestimmen und mit den Werten von NPH-Insulin zu vergleichen. Der Vergleich der pharmakokinetischen Kenngrößen zwischen den Insulin Lispro enthaltenden Formulierungen und NPH-Insulin war aufgrund der unter 3.6 beschriebenen Probleme bei der Bestimmung der FIRI-Konzentration nicht möglich. Es konnten nur pharmakokinetische Vergleiche zwischen den Formulierungen LM, MM und NPL-Insulin durchgeführt werden. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen einer Studie mit gesunden Probanden mit den gleichen verwendeten Insulinformulierungen (Heise [1998]) verglichen.

5.1 Studiendesign

Am Morgen des jeweiligen Versuchstages wiesen die Patienten häufig deutlich erhöhte Blutglukosekonzentrationen auf. Dies legt den Schluß nahe, daß die Patienten die geforderte nächtliche Eigenmessung der Blutglukosekonzentration vor dem jeweiligen Versuchstag, mit eventuell notwendiger eigenständiger Insulinapplikation, nur unzureichend durchgeführt haben bzw. daß die durchgeführte Insulinapplikation nur eine ungenügende Stabilisierung der Blutglukosekonzentration zur Folge hatte. Die im Studienprotokoll vorgesehene Vorlaufphase von 3 h reichte bei einigen Patienten nicht aus, um den erwünschten Startwert der Blutglukosekonzentration von 90 ± 10 mg/dl nur mittels der basalen i.v. Insulininfusion zu erreichen (s. 2.7). Dies hatte zur Folge, daß der Studienarzt zusätzlich zu der basalen Insulininfusion intravenöse Insulinboli verabreichte, um die Blutglukosekonzentration auf den angestrebten Zielwert abzusenken. Das zusätzlich intravenös verabreichte Insulin hatte die bei 3.2 beschriebenen Überhangeffekte mit metabolischer Wirkung in der eigentlichen Versuchsphase zur Folge.

Die Blutglukose verblieb bei dieser Studie bei allen Patienten für einen Zeitraum von ca. 8-10 h nach Applikation von LM oder MM bei einem Zielwert von 90 mg/dl oder nur geringfügig darüber. Die Aufrechterhaltung eines konstant stabilen Blutglukose-

spiegels war nach Gabe von NPL- und NPH-Insulin, beides Formulierungen mit den Eigenschaften eines Verzögerungsinsulins, schwierig, da diese Insulinformulierungen einen verzögerten Wirkungseintritt aufweisen und somit keine unmittelbar einsetzende Stoffwechselkontrolle ermöglichen. Zur probaten Berücksichtigung dieser Problematik wurde die basale Insulininfusion in der Stunde nach Applikation des jeweiligen Testinsulins stufenweise reduziert (s. 2.6.2). Dieses Prozedere unterstützte die Intention, den Blutglukosespiegel der Patienten für den Zeitraum, in dem noch keinerlei Stoffwechselwirkung von NPL- und NPH-Insulin zu erwarten war, stabil zu halten, trug aber sicherlich in Summation mit den i.v. applizierten Insulinboli aus der Versuchsvorlaufphase ebenfalls zu den unerwünschten Überhangeffekten bei (s. 3.2).

Um bei ähnlich angelegten Studien diese sich anhand von Überhangeffekten ergebende Problematik zu minimieren bzw. zu vermeiden und um standardisierte Ausgangswerte sowohl der Glykämie als auch der Insulinämie bei allen Patienten und Versuchstagen etablieren zu können, sollte bei zukünftigen Studien zur Untersuchung von Insulinwirkprofilen mit Diabetikern die Versuchsvorlaufphase deutlich verlängert werden. Eine sinnvolle Option läge darin, die Patienten schon in der Nacht vor dem eigentlichen Versuchstag mit einem Biostator zu konnektieren. Der gewünschte Startwert der Blutglukosekonzentration könnte so mittels der Glukose-Clamp-Technik vorzeitig stabilisiert werden, die Ausgangswerte der Glykämie und der Insulinämie würden in ihrer Schwankungsbreite deutlich reduziert und unerwünschte Überhangeffekte ließen sich vermeiden. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich angewandt [24].

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Pharmakodynamik

5.2.1.1 Blutglukosekonzentration

Die Mittelwerte der Blutglukosekonzentration zeigten den erwarteten Verlauf bis 6 h nach Applikation (s. Abbildung 4 und 5). Die Mittelwerte der Blutglukosekonzentration befinden sich in diesem zeitlichen Intervalls innerhalb des Bereiches des Startwertes von 90 mg/dl (s. Tabelle 5). Nach dieser Zeitspanne kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der mittleren Blutglukosekonzentrationen. Dies spiegelt die

nachlassende Stoffwechselwirkung der jeweiligen Insulinformulierung wieder. In der Zeit von 13 bis 16 h für LM, 12 bis 14 h für MM, 10 bis 14 h für NPL-Insulin und 9 bis 12 h für NPH-Insulin kam es zu einer vermeintlich wieder verstärkt einsetzenden Stoffwechselwirkung des jeweiligen Insulins. Dies läßt sich aus den in Abbildung 5 in diesem Intervall jeweils wieder absinkenden Kurven der mittleren Blutglukosekonzentrationen schließen. Diese durch die vorzeitig beendeten Versuche verursachten Verläufe der Blutglukosekonzentrationen wurden durch die Methode des „last-value-carried-forward“ reduziert (s. 2.10.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 und Tabelle 6 dargestellt.

Trotz der adjustierten Daten, welche die Stoffwechselwirkung der Insulinformulierungen besser reflektieren, macht sich der Einfluß der vorzeitig beendeten Versuche auf die Mittelwerte der Blutglukosekonzentrationen weiterhin störend bemerkbar. Dies wird in Abbildung 6 für den Verlauf der Mittelwertkurven der Blutglukosekonzentration von NPL- und NPH-Insulin deutlich. Im Vergleich von Abbildung 5 und 6 kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Mittelwertkurven in den oben angeführten Zeitintervallen. Für die Kurven von NPL- und NPH-Insulin aber wird das Phänomen einer scheinbar wieder verstärkten Stoffwechselwirkung des entsprechenden Insulins nur minimiert und nicht wie bei den Kurven von LM und MM nahezu vollständig aufgehoben.

Im weiteren Verlauf der vorzeitig beendeten Versuche wäre es aufgrund der Insulinopenie zu einem kontinuierlichen Anstieg der Blutglukosekonzentration bei den Patienten mit Diabetes mellitus gekommen [25]. Diese Zunahme hätte zu weit höheren Konzentrationswerten der Blutglukose geführt, als sie mit der Methode des „last-value-carried-forward“ berücksichtigt wurden. Mit diesen „realen“ Daten wäre eine exaktere Darstellung der Wirkung der Insulinformulierungen als mit den adjustierten Werten zustande gekommen. Als Folge dessen hätten sich die in Abbildung 6 darstellenden Tendenzen, zu einer erneut einsetzenden Stoffwechselwirkung von NPL- und NPH-Insulin, noch weiter reduziert. Um aber für die Patienten die negativen Wirkungen einer länger andauernden Hyperglykämie zu vermeiden, die bei den durchgeführten Versuchen in der Zeit vom vorzeitigen Versuchsende bis zum regulären Versuchsende maximal bis zu 9 h gedauert hätte, wurden bewußt die

schlechteren Ergebnisse in Kauf genommen und alle Versuche bei dem Erreichen einer Blutglukosekonzentration von 200 mg/dl vorzeitig beendet.

Es muß daher angenommen werden, daß trotz der verwendeten adjustierten Daten die sich in Abbildung 6 abzeichnende Tendenz einer wiederkehrenden Stoffwechselwirkung von NPL- und NPH-Insulin nach einer Zeit von ca. 9 – 14 h durch die vorzeitig abgebrochenen Versuche verursacht wird. Ein zweiter Peak der Stoffwechselwirkung dieser beiden Insulinformulierungen kann mit relativer Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die in Tabelle 6 dargestellten Mittelwerte der Blutglukosekonzentration reflektieren mit ihrem Verlauf die Dauer der Stoffwechselaktivität der verschiedenen Insulinformulierungen. Ein Anstieg der Blutglukosekonzentration spiegelt die nachlassende Wirkung des jeweiligen Insulins wieder. Für die untersuchten Insulinformulierungen ergibt sich die folgende Reihenfolge in der Dauer der Stoffwechselaktivität: NPL-Insulin = NPH-Insulin > LM > MM, was bedeutet, daß NPL- und NPH-Insulin die längste Stoffwechselaktivität zeigen, gefolgt von LM und MM (s. Abbildung 6). Die Ähnlichkeit der Pharmakodynamik von NPL- und NPH-Insulin wurde ebenfalls in Studien von De Felippis, Janssen, und Roach beobachtet [9, 14, 26]. Der Unterschied zwischen LM und MM läßt sich mit dem unterschiedlichen prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro erklären. LM mit einem Anteil von 25% löslichem Insulin Lispro besitzt mit 75% NPL-Insulin einen höheren Anteil an Verzögerungsinsulin als MM mit 50%, und zeigt entsprechend im Vergleich mit MM eine längere blutglukosesenkende Wirkung.

Die Reihung der Dauer der Stoffwechselwirkung entspricht den erwarteten Wirkprofilen von Verzögerungsinsulinen (NPL- und NPH-Insulin) und Mischinsulinformulierungen, die aus einem kurzwirksamen Insulin und einem Verzögerungsinsulin mit unterschiedlicher prozentualer Zusammensetzung (LM und MM) bestehen.

5.2.1.2 Glukoseinfusionsraten

Der Verlauf der Glukoseinfusionsraten reflektiert umgekehrt proportional ebenso wie der Verlauf der Blutglukosekonzentration die Stoffwechselwirkung der jeweiligen Insulinformulierung. Aus einem Anstieg der GIR kann eine erhöhte Glukoseutili-

sation und somit eine Zunahme der Stoffwechselwirkung des verwendeten Insulins abgeleitet werden.

Die bei der vorliegenden Studie ermittelten Glukoseinfusionsraten wurden durch die basale Insulininfusion und die i.v. Insulinboli aus der Vorlaufphase beeinflusst (s. 2.12 und 3.2 und Abbildung 7, 8 und 9). Die verwendete Methode zur Adjustierung der Daten führte zu einer deutlichen Reduzierung der aus der Vorlaufphase überhängenden Wirkung (s. Abbildung 8). Sie erreichte aber zum Zeitpunkt der Insulinapplikation bei $t = 0$ min noch keine optimalen Versuchsbedingungen mit einer GIR von nahezu 0. Wie bereits erläutert, kann diese Problematik durch eine deutlich verlängerte Versuchsvorlaufzeit vermieden werden.

Die Kurven der durchschnittlichen GIR-Werte zeigen wie in Abbildung 9 dargestellt, daß die Werte für GIR_{max} bei MM am höchsten sind, gefolgt von LM, NPL- und NPH-Insulin. Dies entspricht der erwarteten Stärke der Stoffwechselwirkung der jeweiligen Insulinformulierung (s. 5.2.1.1). Bei NPH-Insulin waren die GIR_{max} -Werte im Vergleich mit NPL-Insulin nicht signifikant niedriger (s. Tabelle 7). Der Verlauf der Kurve der mittleren GIR von NPH-Insulin ist typisch für eine Insulinformulierung mit den Eigenschaften eines Verzögerungsinsulins und entspricht den in Studien von De Felippis, Roach, und Janssen gefundenen Verläufen [9, 13, 14].

Die $tGIR_{max}$ -Werte die sich in der Reihung NPH-Insulin<MM<LM<NPL-Insulin darstellen, weisen einen unerwartet frühen Zeitpunkt für NPH-Insulin auf, mit ähnlichen Werten, wie sie bei MM beobachtet wurden (s. Tabelle 7). Diese Beobachtung läßt sich mit der zu diesem Zeitpunkt noch andauernden metabolischen Aktivität der i.v. Insulininfusion und der i.v. Insulinboli aus der Vorlaufphase der Versuche und den daraus resultierenden Überhangeffekten erklären und muß somit als durch den Versuchsablauf bedingter Artefakt angesehen werden.

Die Werte für G_{tot} wurden in drei zeitliche Intervalle untergliedert: 0-5 h, 5-19 h und 0-19 h. Dies ermöglicht Aussagen über die rasch einsetzende, die verzögert einsetzende und die gesamte Stoffwechselwirkung der jeweiligen verwendeten Insulinformulierung. Die gefundene und in Abbildung 13 dargestellte positiv monotone Relation zwischen $G_{tot}0-5$ und dem Anteil an löslichem Insulin Lispro entspricht den

erwarteten pharmakodynamischen Eigenschaften eines Verzögerungsinsulins bzw. denen einer Insulinformulierung mit Anteilen an löslichem Insulin Lispro. NPH- und NPL-Insulin mit einem Anteil von 0% an löslichem Insulin Lispro zeigen in diesem Intervall den geringsten Verbrauch an infundierter Glukose, wohingegen die Menge an infundierter Glukose in den Formulierungen LM mit 25% Anteil an löslichem Insulin Lispro und MM mit 50% zunimmt.

Eine statistisch gesicherte negative Korrelation für $G_{\text{tot}5-19}$, wie sie bei der Studie mit gesunden Probanden (Heise [1998]) gefunden wurde, läßt sich anhand der vorliegenden Daten (s. Abbildung 14) nicht bestätigen. Dies ist wahrscheinlich durch die geringe Anzahl an Studienteilnehmern bedingt.

Für $G_{\text{tot}0-19}$ stellt sich die gleiche ansteigende Reihenfolge wie für $G_{\text{tot}0-5}$ dar: NPH-NPL-Insulin, LM und MM. Dies entspricht den pharmakodynamischen Eigenschaften: Verzögerungsinsulin, Verzögerungsinsulin, Insulinformulierung mit 25% Anteil an löslichem Insulin Lispro und Insulinformulierung mit 50% Anteil an löslichem Insulin Lispro (s. 3.3 und Abbildung 12).

5.2.2 Pharmakokinetik

5.2.2.1 Bestimmung der FIRI- und FIL-Konzentration

Die Konzentrationen von Freiem Immunoreaktiven Insulin und Freiem Insulin Lispro wurde bei dieser Studie mittels eines Radio-Immunassays bestimmt (s. 2.9.2, ff.). Zum Nachweis von Insulin Lispro wurde ein spezieller RIA entwickelt. Die geringe Anzahl an verwertbaren Ergebnissen der Konzentrationsbestimmungen von Freiem Insulin und Insulin Lispro bei dieser Studie (s. 2.10.4 und 2.10.5) basieren möglicherweise auf Problemen des verwendeten RIA's. Wie in einer Studie von Burge [22] erläutert, kommt es in Abhängigkeit von dem verwendeten Antikörper zu variierenden Ergebnissen der Sensitivität des jeweiligen RIA's. Es kann daraus gefolgert werden, daß die zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie zur Verfügung stehenden RIA's noch keine ausreichend verlässliche analytische Nachweismethode darstellten [27, 28]. Erst in einer 1999 von Bowsher veröffentlichten Studie wird ein Insulin Lispro spezifisch messender RIA beschrieben [27]. Dies könnte die schlechte

Sensitivität des Nachweises für Freies Insulin und Freies Insulin Lispro bei dieser Studie erklären.

Die auswertbaren Daten für FIRI und FIL basieren auf zwei unterschiedlichen Nachweismethoden. Die Methode zum Nachweis von FIL besitzt eine größere Sensitivität als diejenige für FIRI. Bei einigen Blutproben konnten daher FIL-Konzentrationen, aber keine Werte für FIRI nachgewiesen werden, da das Detektionslimit für FIRI im Vergleich zu FIL um das Fünffache höher war. Bei den Versuchen mit NPH-Insulin wurde in keiner der Blutproben FIL nachgewiesen, was die Spezifität des Nachweises für Insulin Lispro bestätigt. In den Blutproben der Patienten, die Formulierungen mit Insulin Lispro appliziert bekamen, korrelierte der Nachweis der FIL- gut mit dem Nachweis der FIRI-Konzentrationen.

5.2.2.2 Vergleich der Insulinkonzentrationen

Die Vergleiche der pharmakokinetischen Messungen limitieren sich auf die Insulin Lispro enthaltenden Formulierungen, da die Messungen der FIRI-Konzentrationen aufgrund der unter 3.6 beschriebenen Schwierigkeiten keine ausreichende Datenbasis lieferten.

Die Mittelwerte der FIL-Konzentrationen zeigen einen ähnlichen Verlauf wie bei einer Studie mit gesunden Probanden (Heise [1998]). Ein früher Peak der FIL-Konzentration ist charakteristisch für die Insulinformulierungen LM und MM, deren Zusammensetzung aus einem rasch absorbierbarem Insulin und einem Verzögerungsinsulin besteht. Der flachere Kurvenverlauf von NPL-Insulin entspricht dem eines reinen Verzögerungsinsulins (s. Abbildung 15). C_{\max} zeigt für LM, MM und NPL-Insulin eine Korrelation zwischen C_{\max} und dem löslichen Anteil an Insulin Lispro.

Die beobachteten Differenzen zwischen NPH-, NPL-Insulin, LM und MM bei der Betrachtung der t_{\max} -Daten spiegeln wie bereits beschrieben, die aufgetretenen Überhangeffekte aus der Vorlaufphase wieder (s. Abbildung 17). Trotzdem zeigen die gefundenen Daten, mit Ausnahme der NPH-Werte, mit steigendem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro eine Abnahme der t_{\max} -Werte, was einer Zunahme der stoffwechselaktiven Menge an schnell absorbierbarem Insulin Lispro entspricht.

Der Vergleich der FIL-AUC₀₋₁₉-Werte zeigt kaum Differenzen zwischen LM und MM, für NPL-Insulin aber signifikant niedrigere Werte (s. Tabelle 8 und Abbildung 18). Da die Probanden an allen Versuchstagen die gleiche Insulindosis unter standardisierten Bedingungen s.c. injiziert bekamen (s. 2.2), können die niedrigeren FIL-AUC₀₋₁₉-Werte nur mit den Schwierigkeiten bei der Insulinkonzentrationsbestimmung erklärt werden.

Die FIRI-AUC₀₋₅-Werte zeigen im Vergleich mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro in Abbildung 19 eine positive lineare Korrelation. Dies deckt sich mit der Annahme, daß nach Injektion eines Verzögerungsinsulins in den ersten 5 h nach Applikation aus den subkutanen Depots weniger Insulin absorbiert wird, als nach Injektion einer Insulinformulierung, die 25 bzw. 50% eines kurzwirksamen Insulins beinhaltet.

Für die Korrelation der FIRI-AUC₅₋₁₉-Werte mit dem prozentualen Anteil an löslichem Insulin Lispro wurde eine negative Beziehung erwartet. Die gefundene Korrelation zeigt aber eine so geringe negative Steigung, daß von einer statistisch gesicherten Korrelation nicht ausgegangen werden kann (s. Abbildung 20). Die Annahme, daß NPL-Insulin mit den pharmakokinetischen Eigenschaften eines Verzögerungsinsulins in dem zeitlichen Intervall von 5-19 h nach Applikation mehr Insulin freisetzt als die Insulinformulierungen mit löslichem Insulin Lispro, bestätigte sich an den vorliegenden Daten nicht. Wahrscheinlich liegt dies ursächlich an der Problematik bei der Bestimmung der Insulinkonzentrationen.

5.2.3 Insulinantikörper

Die beobachteten Titer der Insulinantikörper scheinen keinen klinisch relevanten Einfluß auf die Pharmakodynamik von freiem Insulin zu haben. In einer Studie von Peters (1995) ließ sich eine geringe Abnahme der C_{max}-, t_{max}-Werte sowie der AUC unter Anwesenheit von meßbaren Insulinantikörpern nachweisen. Trotzdem korrespondierte die Glukoseutilisation mit der freien Insulinkonzentration [32]. Die bei den Patienten Nr. 2, 6 und 9 gefundenen Werte für kreuzreaktive Antikörper von über 10% (s. Tabelle 8) führten bei der vorliegenden Studie zu keinerlei nachweisbaren Auswirkungen auf die Pharmakodynamik bzw. die Pharmakokinetik [29].

Die im Durchschnitt erhöhten Werte für Insulinantikörper sind wahrscheinlich durch die bei dieser Studie vorgefundene durchschnittliche Dauer des Diabetes mellitus Typ 1 von 15,4 Jahren bedingt [30].

5.3 Vergleich von Patienten mit Diabetes mellitus und gesunden Probanden

Beim Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen einer von Heise 1998 publizierten Studie muß berücksichtigt werden, daß es wie bereits in Kapitel 4 erläutert, im Studiendesign, der Anzahl der partizipierenden Probanden und nicht zuletzt in der differierenden zeitlichen Entwicklung der Blutglukosekonzentration deutliche Unterschiede gab. Unter Berücksichtigung dieser Problematik können die beiden Studien miteinander verglichen werden, um die prognostische Aussagekraft einer Studie mit gesunden Probanden auf nachfolgende Studien mit Patienten mit Diabetes mellitus abschätzen zu können.

Der Vergleich der absoluten GIR-Werte zeigt, für die gesunden Probanden einen deutlich höheren Verbrauch an Glukose als für die Patienten mit Diabetes mellitus (s. Abbildung 21). Die bei den Patienten mit Diabetes mellitus im Versuchsverlauf nach einiger Zeit kontinuierlich ansteigenden Blutglukosekonzentrationen können dies nicht erklären, da der Anstieg der Blutglukosekonzentration erst nach ca. 9 h signifikant wird (s. Tabelle 5), aber bereits kurz nach Applikation der jeweiligen Insulinformulierung Differenzen der GIR-Werte zu beobachten sind (s. Abbildung 21).

Abbildung 22 zeigt, daß der Verlauf der prozentualen mittleren Glukoseinfusionsraten bei den Insulinformulierungen LM und MM nahezu identisch ist. Bei NPL-Insulin ist er ähnlich, aber durch einen Peak nach ca. 2 h bei den Patienten mit Diabetes mellitus verzerrt (s. 4.1). Der Verlauf der Kurven entspricht den von Heise gefundenen Ergebnissen und zeigt die typischen Stoffwechselwirkungen dieser Insulinformulierungen, d.h. ein Verzögerungsinsulin und zwei Mischinsulinformulierungen (LM und MM).

Entsprechend den Differenzen bei den absoluten GIR-Werten zeigen sich allerdings beim Vergleich der $G_{\text{tot}0-5}$ - und der GIR_{max} -Werte deutliche Unterschiede der absoluten Meßergebnisse (s. Abbildung 23 und 24).

Der Vergleich der tGIR_{max} -Werte dagegen zeigt bei den Versuchen mit LM und MM keine Unterschiede bei den beiden Studien. Die Versuche mit NPL-Insulin weisen allerdings erhebliche zeitliche Unterschiede auf: Der Mittelwert der tGIR_{max} -Werte bei Patienten mit Diabetes mellitus ist ca. 120 min früher als bei den gesunden Probanden (s. Abbildung 25). Dies ist mit ziemlicher Sicherheit ursächlich im Einfluß der Überhangeffekte des i.v. applizierten Insulins aus der Versuchsvorlaufphase begründet (s. 3.2). Durch diese Annahme läßt sich ebenfalls der Peak nach ca. 2 h bei den Glukoseinfusionsraten der Patienten mit Diabetes mellitus (s.o. und Abbildung 21) und die dadurch in Abbildung 22 verzerrte Darstellung beim prozentualen Vergleich der mittleren GIR zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus bei den Versuchen mit NPL-Insulin erklären.

Subsumierend sprechen die Ergebnisse dieses Vergleiches unter Berücksichtigung der oben erläuterten Problematik für vergleichbare pharmakodynamische Eigenschaften der verwendeten Insulinformulierungen bei Patienten mit Diabetes mellitus und gesunden Probanden.

Der Vergleich der gemessenen Insulinkonzentrationen zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus zeigt deutliche Differenzen der absoluten Werte (s. Abbildung 26), bei allerdings parallelen Kurvenverläufen der IRI- bzw. FIL-Konzentrationen von LM, MM und NPL-Insulin. Für C_{max} (s. Abbildung 27), t_{max} , bzw. FIL-AUC_{0-5} , IRI-AUC_{0-6} (s. Abbildung 28), FIL-AUC_{0-19} und IRI-AUC_{0-19} zeigen sich ebenfalls Differenzen bei den absoluten Werten. In Tabelle 12 zeigt der prozentuale Vergleich der pharmakokinetischen Parameter, daß sich im Vergleich der verschiedenen pharmakokinetischen Parameter immer die gleiche Reihenfolge der Insulinformulierungen bei beiden Studien darstellt. Auch diese Beobachtung unterstützt die Aussage, daß die verschiedenen untersuchten Insulinformulierungen die gleichen pharmakokinetischen Eigenschaften bei beiden Probandengruppen aufweisen.

Die beobachteten Unterschiede in der Stärke der metabolischen Wirkung lassen sich vermutlich durch Unterschiede in der Insulinsensitivität von gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus erklären [31, 32, 33, 34].

Der Vergleich der pharmakokinetischen Parameter zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus zeigt, korrespondierend zu den pharmakodynamischen Parametern, höhere absolute Werte, prozentual aber gleiche Verläufe bzw. Ergebnisse, woraus resultierend die Annahme gezogen werden kann, daß die Pharmakokinetik der untersuchten Insulinformulierungen gleiche Profile bei gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus aufweist. Die Stärke der Stoffwechselwirkung der getesteten Insulinformulierungen kann anscheinend nicht direkt aus den Ergebnissen der Studie mit gesunden Probanden auf Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 übertragen werden, da es bei den Absolutwerten zu deutlichen Differenzen sowohl der pharmakodynamischen als auch der pharmakokinetischen Parametern kommt. Da die Insulindosis für jeden Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 individuell titriert wird, stellen Unterschiede in den Absolutwerten der Stärke der Stoffwechselwirkung kein therapeutisches Problem dar.

Die bei 4.3 beschriebene Einfügung der Daten der vorliegenden Studie in das bei gesunden Probanden ermittelte nicht-lineare Modell zeigt in Abbildung 29 und 30, daß es zu einer Gruppierung der Werte der Patienten mit Diabetes mellitus um das niedrigere Ende sowohl für die Korrelation von C_{\max}/GIR_{\max} , als auch für die Korrelation von $FIL/IRI-AUC_{0-5}/G_{\text{tot}0-19}$ kommt. Dies verdeutlicht ebenfalls die Vorhersagemöglichkeiten von solch klinisch-experimentellen Studien mit gesunden Probanden für Studien mit Patienten mit Diabetes mellitus, bzw. die klinische Praxis.

Die gefundenen Ergebnisse dieses Vergleiches zeigen, daß die Ergebnisse von Glukose-Clamp-Versuchen mit gesunden Probanden genutzt werden können, um die pharmakodynamischen Ergebnisse von Studien mit Patienten mit Diabetes mellitus im vorhinein abzuschätzen

6 Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Studie wurden die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von vier Insulinformulierungen unter standardisierten und randomisierten Bedingungen bei 12 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 untersucht. Zusätzlich wurden die ermittelten Ergebnisse mit denen einer Studie mit gesunden Probanden verglichen.

Es nahmen 2 Frauen und 10 Männer mit einem Durchschnittsalter von 33 ± 5 Jahren, einem BMI von $24,3 \pm 1,7 \text{ kg/m}^2$ und einer manifesten Diabetesdauer von 15 ± 4 Jahren teil. Sie bekamen jeweils drei der vier verwendeten Insulinformulierungen NPH- bzw. NPL-Insulin, Mid Mixture bzw. Low Mixture (MM: 50/50, LM: 25/75, Insulin Lispro/NPL-Insulin) subkutan nach einer Versuchsvorlaufphase von 3 h mit einer Dosierung von 0,3 U/kg in das Abdomen injiziert und wurden insgesamt für 24 h unter stationären Bedingungen mittels der Glukose-Clamp-Technik überwacht.

Die Blutglukosekonzentrationen verblieben in den ersten 8 h nach Applikation bei dem Startwert von 90 mg/dl oder nur geringfügig darüber (LM: 91 ± 2 , MM: 91 ± 1 , NPL: 96 ± 7 , NPH: 101 ± 13 mg/dl). Es zeigt sich mit zunehmender Versuchsdauer ein kontinuierlicher Anstieg der Blutglukosekonzentration, der auf die absinkende metabolische Insulinwirkung zurückzuführen ist. Bei einigen Probanden erreicht die Blutglukosekonzentration Werte von >200 mg/dl vor Ablauf des regulären Versuchsendes. In diesen Fällen wurden die Versuche zur Vermeidung einer länger andauernden Hyperglykämie vorzeitig abgebrochen.

Zu Versuchsbeginn zeigte sich bei einigen Patienten deutlich erhöhte Blutglukosekonzentrationen, die mittels einer basalen Insulininfusion und durch (wenn nötig) i.v. Insulinboli in den ersten 3 h der Versuche auf den Startwert von 90 mg/dl abgesenkt wurden. Dies hatte Überhangeffekte in die eigentliche Versuchszeit zur Folge, die zu erhöhten GIR zum Zeitpunkt $t = 0$ h führten. Es wurde versucht mittels eines mathematischen Modells diese Effekte in der Auswertung zu berücksichtigen. Die Werte für GIR_{max} zeigten in der Reihenfolge NPL-Insulin, LM, MM ($4,1 \pm 2,3$, $4,9 \pm 2,2$, $7,7 \pm 2,2$ mg/kg/min) den erwarteten Anstieg in der metabolischen Wirkung mit Zunahme des prozentualen Anteils an Insulin Lispro. Korrespondierend dazu sanken

die $tGIR_{max}$ -Werte mit Zunahme des prozentualen Anteils an Insulin Lispro, (225 ± 236 , 158 ± 98 , 113 ± 30 min für NPL-Insulin, LM, MM).

Die gemessenen Werte für C_{max} ($1,5 \pm 0,6$, $1,1 \pm 0,4$, $0,3 \pm 0,2$ ng/ml), sowie für t_{max} (68 ± 23 , 83 ± 34 , 165 ± 169 min, für MM, LM, NPL-Insulin) zeigen die erwartete Reihenfolge bei den beiden Mischinsulinen mit unterschiedlichem prozentualen Anteil von Insulin Lispro von 50 bzw. 25% (MM, bzw. LM) und dem Verzögerungsinsulin (NPL-Insulin). Die FIRI-AUC₀₋₅-Werte zeigen im Zusammenhang mit dem prozentualen Anteil an Insulin Lispro eine positive lineare Korrelation.

Der Vergleich der vorliegenden, mit einer Studie mit gesunden Probanden zeigt trotz der Unterschiede im Studiendesign, der Anzahl der partizipierenden Probanden und der differierenden zeitlichen Entwicklung der Blutglukosekonzentration, daß die pharmakodynamischen und die pharmakokinetischen Parameter in ihren absoluten Werten differieren. Der Vergleich der prozentualen Daten hingegen zeigt nahezu identische Verläufe der GIR- und der FIL/IRI-Konzentration von Patienten mit IDDM und gesunden Probanden.

Zusammenfassend betrachtet hat die vorliegende Studie die erwarteten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Mischinsulinformulierungen mit Insulin Lispro und NPL-Insulin bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 bestätigt. Die Annahme, daß Glukose-Clamp-Studien mit gesunden Probanden relevante Aussagen zu nachfolgenden Studien mit Patienten mit Diabetes mellitus erlauben, konnte anhand dieser Studie verifiziert werden.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten Abkürzungen sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

Abkürzung	Bezeichnung	Einheit
AP	Anzahl Patienten	-
AUC	Fläche unter der Kurve (area under curve)	[ng•h/ml]
AUC ₀₋₁₉	Fläche unter der Kurve in der Zeit von 0 – 19 h	[ng•h/ml]
AUC ₀₋₆	Fläche unter der Kurve in der Zeit von 0 – 6 h	[ng•h/ml]
AUC ₀₋₅	Fläche unter der Kurve in der Zeit von 0 – 5 h	[ng•h/ml]
AUC ₅₋₁₉	Fläche unter der Kurve in der Zeit von 5 – 19 h	[ng•h/ml]
BMI	Body Mass Index	[kg/m ²]
C _{max}	Maximale Insulinkonzentration	[μU/ml]
EKG	Elektrokardiogramm	-
FIL	Freies Insulin Lispro	[ng/ml]
FIRI	Freies Immunoreaktives Insulin	[ng/ml]
GIR	Glukoseinfusionsrate	[mg/kg/min]
GIR _{max}	Maximale Glukoseinfusionsrate	[mg/kg/min]
G _{tot}	Gesamtmenge an infundierter Glukose	[g/kg]
G _{tot0-19}	Menge an infundierter Glukose in der Zeit von 0 – 19 h	[g/kg]
G _{tot0-5}	Menge an infundierter Glukose in der Zeit von 0 – 5 h	[g/kg]
G _{tot5-19}	Menge an infundierter Glukose in der Zeit von 5 – 19 h	[g/kg]
HM	High Mixture (75%: 25%, Insulin Lispro: NPL)	[U]
IDDM	Insulin Dependend Diabetes Mellitus	-
IE	Internationale Einheit	-
IRI	Immunoreaktives Insulin	[U]
i.v.	intravenös	-
KG	Körpergewicht	[kg]
LM	Low Mixture (25%: 75%, Insulin Lispro: NPL)	[U]
Max	Maximum	-
Min	Minimum	-

MM	Mid Mixture (50%: 50%, Insulin Lispro: NPL)	[U]
MNR-Klinik	Medizinisch-Neurologisch-Radiologische Klinik	-
N	Anzahl	-
NPH-Insulin	Neutrales Protamin-Hagedorn Insulin	[IE]
NPL-Insulin	Neutral Protamin-Lispro Insulin	[IE]
RIA	Radio-Immunassay	-
s.c.	subkutan	-
SD	Standardabweichung	-
tGIR _{max}	Zeit bis zum Erreichen der max. Glukoseinfusionsrate	[min]
t _{max}	Zeit bis zum Erreichen der max. Insulinkonzentration	[min]
U	Unit (Insulineinheit)	[U]

7.2 Literaturverzeichnis

- [1] Berger, M.: *Diabetes mellitus*, Urban & Schwarzenberg Verlag, München, (1995)
- [2] Berger, M., Jörgens, V.: *Praxis der Insulintherapie*, 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, (1995)
- [3] Torlone, E., Pampanelli, S., Lalli, C., Del Sindaco, P., Di Vincenzo, A., Rambotti, A. M., Modarelli, F., Epifano, L., Kassi, G., Periello, G., Brunetti, P., Bolli, G.: *Effects of the short-acting insulin analog [Lys(B28)Pro(B29)] on postprandial blood glucose control in IDDM*, *Diabetes Care*, (1998): 235-239
- [4] Rassam, A. G., Zeise, T. M., Burge, M. R., Schade, D. S.: *Optimal administration of lispro insulin in hyperglycemic type 1 diabetes*, *Diabetes Care*, Vol 22,(1999): 133-136
- [5] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT): *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent Diabetes mellitus*, *New Engl. J. Med.*, Vol 329, (1993): 977-986
- [6] Di Marchi, R. D., Trautmann, M. E.: *Insulin Lispro: Molekularstruktur und biologische Wirkung*, *Diabetes und Stoffwechsel*, Vol 5, (1996):113-117
- [7] Schmauß, S., Landgraf, R.: *Der Einsatz des Insulin-Analogons LYS(B28), PRO(B29) in der Behandlung des Diabetes mellitus*, *Diabetes und Stoffwechsel*, Vol 5, (1996): 117-121
- [8] Birnbaum, D. T., Kilcomons, M., De Fillipis, M. R., Beals, J. M.: *Assembly and Dissociation of Human Insulin Lys^{B28} Pro^{B29}-Insulin Hexamers: A Comparison Study*, *Pharmaceutical Research*, Vol 14, (1997): 25-36

-
- [9] De Fillippis, M. R., Bakaysa, D. L., Bell, M. A., Heady, M. A., Li, S., Pye, S., Youngman, K. M., Radziuk, J., Frank, B. H.: *Preparation and Characterization of a Cocrystalline Suspension of [Lys^{B28}, Pro^{B29}]-Human Insulin Analogue*, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 87, (1998): 170-176
- [10] Torlone, E., Fanelli, C., Rambotti, A. M., Kassi, G., Modarelli, F., Di Vincenzo, A., Epifano, L., Ciofetta, M., Pampanelli, S., Brunetti, P., Bolli, G. B.: *Pharmacokinetics, pharmacodynamics and glucose counterragulation following subcutaneous injection of the monomeric insulin analogue [Lys(B28),Pro(B29)] in IDDM*, Diabetologia, Vol 37 (1994): 713-720
- [11] Heinemann, L., Woodworth, J.: *Pharmacokinetics and glucodynamics of Insulin Lispro*, Drugs of Today, Vol 34, (1998): 23-36
- [12] Trautmann, M. E.: *Effect of the Insulin Analogue [LYS(B28), PRO(B29)] on Blood Glucose Control*, Horm. Metab., Vol 26, (1994): 588-590
- [13] Roach, P., Yue, L., Arora, V.: The Humalog Mix25 Study Group, *Improved Postprandial Glycemic Control During Treatment With Humalog Mix25, a Novel Protamine-Based Insulin Lispro Formulation*, Diabetes Care, Vol 22, (1999): 1258-1261
- [14] Janssen, M. M., Casteleijn, S., Deville, W., Popp-Sneijders, C., Roach, P., Heine, R. J.: *Nighttime Insulin Kinetics and Glycemic Control in Type 1 Diabetic Patients Following Administration of an Intermediate-Acting Lispro Preparation*, Diabetes Care, Vol 12, (1997): 1870-1873
- [15] Looney, K. S., De Felippis, M. R., Hofer, J. D., Frank, B. H.: *The Chemical Stability of Insulin Lispro Protamine Suspension and Insulin Lispro Mixtures*, Diabetologia, Vol 42, (1998): A244

-
- [16] Heise, T., Weyer, C., Serwas, A., Heinrichs, J., Osinga, J., Roach, P., Woodworth, J. R., Gudat, U., Heinemann, L.: *Time-action profiles of novel premixed preparations of insulin lispro and NPL insulin*, Diabetes Care, Vol 21, (1998): 800-803
- [17] De Fronzo, R. A., Tobin, J. D., Andres, R.: *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*, Am. J. Physiol., Vol 237, (1979): 214-223
- [18] Heinemann, L.: *Pharmakokinetik und Pharmakodynamik verschiedener Insulinpräparationen und Insulin-Analoga*, Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, (1993)
- [19] Clemens, A. H., Hough, D. L., D'Orazio, P. A.: *Development of the Biostator[®] glucose clamp algorithm*, Clin. Chem., Vol 28, (1982): 1899-1904
- [20] Liu, D., Moberg, E., Kollind, M., Lins, P. E., Adamson, U., Macdonald, I. A.: *Arterial, arterialized venous, venous and capillary blood glucose measurements in normal man during hyperinsulinaemic euglycaemia and hypoglycaemia*, Diabetologia, Vol 35, (1992): 287-290
- [21] McGuire, E. A. H., Heldermaun, J. H., Tobin, J. D., Andres, R., Berman, M.: *Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man*, Journal of Application Physiology, Vol 41, (1976): 565-573
- [22] Burge, M. R., McLeod, J., Bowsher, R. R., Schade, D. S.: *Validity of Coat-A-Count Insulin RIA Kit for Quantifying Total and Free Humalog*, Clin. Chem., Vol 42, (1996): 777
- [23] Radziuk, J., Bradley, B. J., Welsh, L., De Felippis, M. R., Roach, P.: *Profiles of biological activity after subcutaneous administration of mixtures of (Lys{B28}-Pro{B29}) insulin (Lispro) in soluble and neutral protamine formulations*, Diabetes, Vol 45, (1996): 218A

-
- [24] Rave, K., Heise, T., Pflutzner, A., Heinemann, L., Sawicki, P. T.: *Impact of diabetic nephropathy on pharmacodynamic and Pharmacokinetic properties of insulin in type 1 diabetic patients*, Diabetes Care, Vol 24, (2001): 886-890
- [25] Siegenthaler, W.: *Klinische Pathophysiologie*, 8. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, (2001)
- [26] Roach, P., Trautmann, M., Arora, V., Sun, B., Anderson, J. H.: *Improved postprandial blood glucose control and reduced nocturnal hypoglycemia during treatment with two novel insulin lispro-protamine formulations, insulin lispro mix25 and insulin lispro mix50*, Clin-Ther., Vol 21 (1999): 523-534
- [27] Bowsher, R. R., Lynch, R. A., Brown-Augsburger, P., Santa, P. F., Legan, W. E., Woodworth, J. R., Chance, R. E.: *Sensitive RIA for the Specific Determination of Insulin Lispro*, Clin. Chem., Vol 45, (1999): 104-110
- [28] Karonen, S. L., Melamies, L., Kostamo, E., Pöyry, K.: *Problems in the Determination of Short-Acting Insulin Analogue by Commercial Insulin Kits*, Diabetes Abstract Book, Vol 44, (1995)
- [29] Armitage, M., Wilkin, T., Wood, P., Casey, C., Loeless, R.: *Insulin autoantibodies and insulin assay*, Diabetes, Vol 37, (1988):1392-1396
- [30] Jovanovic, L. G., Mills, J. L., Peterson, C. M.: *Anti-insulin antibody titers do not influence control or insulin requirements in early pregnancy*, Diabetes Care, Vol 7, (1984): 68-71
- [31] Davis, S. N., Thompson, C. J., Peak, M., Brown, M.D., Alberti, K. G.: *Effects of human insulin on insulin binding antibody production in nondiabetic subjects*, Diabetes Care, Vol 15, (1992): 124-126

-
- [32] Peters, A., Klose, O., Hefty, R., Keck, F., Kerner, W.: *The Influence of Insulin Antibodies on the Pharmacokinetics of NPH Insulin in Patients with Type 1 Diabetes treated with Human Insulin*, Diabetic Medicine, Vol 12, (1995): 925-930
- [33] Van Haeften, T. W.: *Clinical significance of insulin antibodies in insulin-treated diabetic patients*, Diabetes Care, Vol 12,(1989): 641-648
- [34] Zuniga-Guajardo, S., Zinman, B.: *The Metabolic Response to the Euglycemic Insulin Clamp in Type I Diabetes and Normal Humans*, Metabolism, Vol 34, (1985): 926-930

Lebenslauf:

Name:		Bleckmann geb. Puhl
Vorname:		<u>Lothar</u> , Hubert, Martin
Geburtsdatum:		27.07.1971
Geburtsort:		Ludwigshafen am Rhein
Familienstand:		verheiratet mit Cornelia Bleckmann
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Konfession:		evangelisch
Berufstätigkeit:	seit 07/02	Assistenzarzt im Klinikum Krefeld an der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie, plastische Operationen mit Abteilung für Phoniatrie und Pädaudiologie bei Prof. Dr. med. Reinhardt J. Kau
	01/01-06/02	Arzt im Praktikum im Klinikum Krefeld an der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie, plastische Operationen mit Abteilung für Phoniatrie und Pädaudiologie bei Prof. Dr. med. Reinhardt J. Kau
Studium:	04/93-05/00	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Zivildienst:	05/92-12/92	Klinikum der Stadt Ludwigshafen
	10/91-05/92	Kinderzentrum Ludwigshafen
Schulabschluß:	05/91	Abitur
Schulausbildung:	07/82-05/91	Max-Planck-Gymnasium, Ludwigshafen
	08/78-05/82	Rupprecht Grundschule, Ludwigshafen