

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Roden

**Wirkprofile von zwei Insulintherapien:
Basis-Bolus-Therapie mit Insulinanaloga im
Vergleich mit einer konventionellen Therapie
mit Mischinsulinen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marie Bianca Brauns

2013

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. J. Windolf

Referent: Prof. Dr. W. Scherbaum

Korreferent: Prof. Dr. R. Kubitz

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heise T, Heinemann L, Hövelmann U, Brauns B, Nosek L, Haahr HL, Olsen KJ.
Biphasic insulin aspart 30/70: pharmacokinetics and pharmacodynamics compared
with once-daily biphasic human insulin and Basal-bolus-therapy.
Diabetes Care 2009; 32:1431-1433.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellung	6
3. Probanden, Material und Methoden.....	8
3.1 Patienten Ein- und Ausschlusskriterien.....	8
3.2 Studienübersicht	9
3.3 Detaillierter Studienablauf.....	11
3.4 Studienmedikation	13
3.5 Der euglykämische Glucose-Clamp-Versuch	15
3.6 Bestimmungsmethoden	20
3.7 Zielparameter und statistische Auswertung	21
3.7.1 Fallzahlabeschätzung	21
3.7.2 Statistische Methodik.....	21
3.7.2 Analyse der pharmakodynamischen Endpunkte.....	22
4. Ergebnisse	24
4.1 Patienten-Charakteristika.....	24
4.2 Datenauswertung.....	25
4.3 Pharmakodynamik: Glucoseinfusionsraten.....	26
4.3.1 Primäre pharmakodynamische Endpunkte	26
4.3.2 Sekundäre pharmakodynamische Endpunkte	31
4.4 Pharmakokinetik: Insulinkonzentrationen.....	33
4.5 Sicherheitsrelevante Endpunkte	35
4.5.1 Exposition zur Studienmedikation	35
4.5.2 Unerwünschte Ereignisse (Adverse Events).....	35
4.5.3 Sicherheitslaborparameter.....	36
4.5.4 Vitalwerte	37
4.5.5 Körperlicher Untersuchungsbefund.....	37
4.5.6 EKG	37
4.5.7 Sonstige Sicherheitsparameter	37
4.6 Qualität der Glucose-Clampversuche	37
5. Diskussion	39
6. Zusammenfassung	47
7. Literatur.....	48
8. Danksagung.....	57
9. Lebenslauf	58
10. Leistungen der Promovendin	59
11. Eidesstattliche Versicherung.....	59

Anhang 1: Individuelle Wirkprofile.....	60
Anhang 2: Beispiel eines C-Peptidprofils während der Clampversuche	83

1. Einleitung

Nationale und internationale Leitlinien empfehlen für Patienten mit Typ 2 Diabetes zur Vermeidung von diabetischen Spätkomplikationen eine gute Diabeteseinstellung mit Werten für das glykosylierte Hämoglobin (HbA1c) von maximal 7% [1] bzw. 6,5% [2]. De facto erreichen allerdings die meisten Patienten diese Therapieziele nicht. Daten des wiederholt durchgeführten amerikanischen National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) zeigen, dass in den Jahren 1988 -1994 nur 44,5% der amerikanischen Typ 2 Diabetiker HbA1c-Werte von unter 7% erreichten [3]. In der nachfolgenden NHANES-Befragung für die Jahre 1999 – 2000 erreichten sogar nur etwas mehr als ein Drittel (exakt 35,8%) der Patienten mit Typ 2 Diabetes dieses von der amerikanischen Diabetes-Gesellschaft ADA geforderte Therapieziel [3]. Daten in Deutschland sehen nicht wesentlich besser aus: Ein von der Deutschen Diabetes-Gesellschaft für eine gute Diabeteseinstellung empfohlener HbA1c-Wert von maximal 6,5% lag in der Code-2 Studie gerade einmal bei 26% der Patienten mit Typ 2 Diabetes vor, dagegen hatten 45% der Patienten HbA1c-Werte über 7,5% [4].

Auffällig bei allen diesen Untersuchungen war der relativ niedrige Anteil von mit Insulin behandelten Patienten: In beiden NHANES-Untersuchungen erhielten ca. 27% der Patienten Insulin, bei Code-2 waren es 28% (bei allen Studien z.T. in Kombination mit oralen Antidiabetika) [3;4]. Dies legt die Vermutung nahe, dass Patienten mit Typ 2 Diabetes zu spät auf Insulin eingestellt werden, um die von den Fachgesellschaften geforderte gute Diabeteseinstellung zu erreichen. Tatsächlich zeigen Daten der Kaiser Permanente Northwest Datenbank in Amerika, dass bei bislang nicht medikamentös behandelten Patienten erst bei einem HbA1c-Wert von mehr als 8% eine Behandlungsintensivierung (d.h. zumeist die Einleitung einer Therapie mit einem oralen Antidiabetika) bei immerhin zwei Drittel der Patienten erfolgt [5]. Bei Patienten, die bereits mit einem oralen Antidiabetikum (Metformin oder einem Sulfonylharnstoff) behandelt wurden, erfolgt eine Therapie-Intensivierung (in der Regel die Gabe eines weiteren oralen Antidiabetikums) bei HbA1c-Werten größer 8% noch bei 35-45% der Patienten. Wurden die Patienten jedoch bereits mit zwei oralen Antidiabetika vorbehandelt, so dass dann zumeist eine Insulintherapie zum Erreichen einer guten Stoffwechsel-Einstellung erforderlich war, wurde nur bei knapp 19% der Patienten mit HbA1c-Werten über 8% die Therapie intensiviert.

Die seit langem bekannten Barrieren gegen eine rechtzeitige Einleitung einer Insulintherapie haben vielfältige Gründe [6-8], die im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail diskutiert werden. Zur Überwindung dieser Barrieren wurden möglichst einfache Konzepte zur Einleitung einer Insulintherapie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes entwickelt [9]. Dazu gehören insbesondere die zusätzliche Gabe von Basalinsulin zu der bestehenden Therapie mit oralen Antidiabetika, die präprandiale Injektion von kurzwirken-

dem Insulin oder die Gabe von Mischinsulinen. Als Mischinsulin bezeichnet man Mischungen aus Normalinsulin und Verzögerungsinsulin.

Diese Therapien wurden kürzlich in der sogenannten 4T-Studie (Treating to target in Type 2 diabetes (4T) study of analogue insulin initiation and titration) in Bezug auf ihre Effektivität und Nebenwirkungen in einer randomisierten prospektiven Studie über 3 Jahre miteinander verglichen [10;11]. In der Auswertung nach einem Jahr zeigten sich die Vor- und Nachteile der einzelnen Strategien zur Insulin-Initiierung: Wurde lediglich Basalinsulin zusätzlich zu der vorbestehenden Therapie mit oralen Antidiabetika verabreicht, wurden im Vergleich mit einer Therapie mit zweimal täglicher Gabe eines Mischinsulins oder einer Therapie mit dreimal täglicher präprandialer Injektion eines schnellwirkenden Insulin-Analogons signifikant schlechtere HbA1c-Werte erzielt (7,6% vs 7,3% bzw. 7,2%), gleichzeitig war jedoch auch die Hypoglykämierate niedriger sowie die Gewichtszunahme geringer (letzteres allerdings möglicherweise bedingt durch die Verwendung von Insulin Detemir als Basalinsulin, das bekanntermaßen zu einer geringeren Gewichtszunahme führt [12]).

rotz der etwas schlechteren Stoffwechsellkontrolle in der 4T-Studie wird häufig Basalinsulin zur Initiierung einer Insulintherapie bei unter oralen Antidiabetika unzureichend eingestellten Patienten mit Typ 2 Diabetes eingesetzt, da dies bei Verwendung von Insulin-Analoga mit einer ausreichend langen Wirkdauer nur eine subkutane Insulininjektion pro Tag bedeutet [13;14]. Dagegen ist die Einleitung einer Insulintherapie mit kurzwirkendem Insulin international weniger üblich, vor allem wegen der dabei notwendigen relativ hohen Injektionsfrequenz (drei Injektionen pro Tag), der Gefahr einer Gewichtszunahme und der Notwendigkeit häufigerer Blutzuckermessungen [15]. Als Alternative wird insbesondere bei schlecht eingestellten Patienten die zweimal tägliche Gabe eines Mischinsulins angesehen [16].

Unabhängig davon, welche Strategie zur Initiierung einer Insulintherapie bei Patienten mit Diabetes gewählt wird, erfolgt im Krankheitsverlauf praktisch immer eine Intensivierung der Insulinsubstitution. Dies verdeutlichen auch die 3-Jahres Ergebnisse der 4T-Studie: Fast drei Viertel aller Patienten benötigten nach 3 Jahren zwei verschiedene Insulinformulierungen, wobei allerdings die Anzahl zwischen den Behandlungsarmen signifikant unterschiedlich war [11]. Bei den zunächst mit Mischinsulin behandelten Patienten verwendeten 68% nach drei Jahren eine zusätzliche mittägliche Injektion von kurzwirkendem Insulin, während bei den zunächst mit Basalinsulin behandelten Patienten sogar 82% präprandial Insulin spritzen (in der Regel vor jeder Hauptmahlzeit, also dreimal täglich). Die Notwendigkeit einer Intensivierung erklärt sich durch die nachlassende endogene Insulinsekretion bei Patienten mit Typ 2 Diabetes im Krankheitsverlauf [17], allerdings gibt es auch hier unterschiedliche Strategien, wie eine Intensivierung erfolgen kann. Während bei einer initialen Basalinsulin-Therapie meistens zusätzlich kurzwirkende Insulinpräparate vor der Mahlzeit gegeben werden (häufig zunächst eine Injektion vor der größten Mahlzeit, später dann vor jeder

Hauptmahlzeit), wird bei einer Mischinsulin-Therapie häufig die Injektionsfrequenz des Mischinsulins gesteigert. Es wird also mit 1-2 Injektionen (vor der größten Mahlzeit bzw. morgens und abends) begonnen, bis schließlich auch eine dritte Mischinsulin-Injektion mittags verabreicht wird. Dieser Ansatz wurde in der sogenannten 1-2-3 Studie untersucht, einer unkontrollierten, nicht-randomisierten Beobachtungsstudie bei 100 Patienten mit Typ 2 Diabetes [18]. Unter dreimal täglicher Gabe mit einem Mischinsulin erreichten immerhin 77% der Patienten das von der amerikanischen Diabetesgesellschaft empfohlene HbA1c-Level von maximal 7%.

Prinzipiell können die geschilderten Insulintherapien mit Humaninsulin oder mit sogenannten Insulin-Analoga durchgeführt werden [19]. Das Humaninsulin entspricht, wie der Name schon andeutet, in seiner Struktur dem menschlichen, körpereigenen Insulin. Das nicht modifizierte Insulin (auch als Altinsulin bezeichnet) wird als kurzwirkendes Insulin vor den Mahlzeiten gespritzt. Die Wirkung des Humaninsulins kann jedoch galenisch so verzögert werden, dass es zur Substitution des basalen Insulinbedarfs verwendet werden kann. Dazu wird das Humaninsulin zumeist an den basischen Eiweißkörper Protamin gebunden (neutrales Protamin Hagedorn = NPH).

Die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Humaninsulin-Präparate nach subkutaner Injektion sind jedoch für eine Insulintherapie nicht optimal. Altinsulin weist ein relativ spätes Wirkmaximum (ca. 2,5 h nach Injektion) und insbesondere in höherer Dosierung eine lange Wirkdauer von z.T. mehr als 10 h auf und wirkt damit deutlich später und länger als endogenes Insulin [19-21]. NPH-Insulin weist, im Gegensatz zur basalen Insulinausschüttung [22], einen deutlichen Wirkungspfel auf, zudem wirkt es nicht über 24 Stunden und ist in seiner Wirkung sehr variabel [23;24].

Zur Überwindung dieser Nachteile wurden Insulin-Analoga entwickelt. Insulin-Analoga weichen in ihrer Primärstruktur leicht von humanem Insulin ab. Bei den kurzwirkenden Insulin-Analoga wird durch den Austausch von einigen Aminosäuren die Selbstassoziation der Insulinmoleküle zu Hexameren (Zusammenschluss von 6 Insulinmolekülen) geschwächt. Dadurch zerfallen sie nach Injektion in das subkutane Insulingewebe schneller in Dimere und Monomere als dies bei Humaninsulin der Fall ist, so dass raschwirkende Insulinanaloga schneller absorbiert werden und somit einen schnelleren Wirkbeginn und eine kürzere Wirkdauer aufweisen [19].

Kommerziell verfügbar sind zur Zeit drei kurzwirkende Insulin-Analoga: Insulin Lispro (die Veränderung zu Humaninsulin betrifft eine Vertauschung der Aminosäuren Lysin und Prolin an den Positionen 28 und 29 der B-Kette), Insulin Aspart (Austausch von Prolin an Position 28 der B-Kette durch Asparaginsäure) und Insulin Glulisin (Austausch von Asparagin an Position 3 der B-Kette durch Lysin sowie Austausch von Lysin an Position 29 der B-Kette durch Glutaminsäure). Aufgrund der veränderten Struktur von Insulin Glulisin bildet sich eine Salzbrücke zwischen Glutamat an Position B29 und Glycin an Position A1, so dass auf Zink als Stabilisator verzichtet werden kann.

Neben kurzwirksamen wurden auch langwirkende Insulinanaloga entwickelt, bei denen eine verzögerte Absorption aus dem subkutanen Fettgewebe erreicht werden sollte. Dabei kommen unterschiedliche Mechanismen zur Anwendung: Bei Insulin Glargin wird Asparaginsäure an Position A21 durch Glycin ersetzt und die B-Kette durch 2 Aminosäuren verlängert. Insulin Glargin ist im neutralen pH-Bereich nur gering löslich, während es in der leicht sauren Injektionslösung (pH 4) vollständig gelöst vorliegt. Nach der Injektion in das Subkutangewebe wird die saure Lösung neutralisiert, was zu einer Bildung von Mikropräzipitaten führt und die Absorption verzögert. Insulin Glargin wird im Subkutangewebe an der Carboxygruppe der B-Kette teilweise abgebaut. Dabei entstehen die aktiven Metaboliten M1 (21A-Gly-Insulin) und M2 (21A-Gly-des-30B-Thr-Insulin) [25;26].

Dagegen wird beim zweiten kommerziell erhältlichen langwirkenden Insulinanalogon, Insulin Detemir, ein völlig anderes Verzögerungsprinzip angewendet. Bei Insulin Detemir wird die C-terminale Aminosäure Threonin (B30) entfernt und an der ϵ -Aminofunktion des Lysins an B29 eine Fettsäure (Myristinsäure) kondensiert. Die verzögerte Wirkung von Insulin Detemir wird durch die starke Selbstassoziation von Insulin Detemir Molekülen an der Injektionsstelle (Bildung von Di-Hexameren) und die Bindung an Albumin über die Fettsäure-Seitenkette, die sowohl an der Injektionsstelle als auch nach der Absorption ins Blut im Plasma stattfindet, vermittelt [27].

Neben der Formulierung von rasch oder langwirkenden Insulin-Analoga ist auch die Formulierung von Mischinsulinen mit kurz- und langwirkenden Insulinformulierungen beziehungsweise Insulin-Analoga möglich. Wie bei den Mischungen mit Humaninsulinformulierungen wird dabei in verschiedenen Verhältnissen das unveränderte raschwirkende Insulin-Analog mit einem an Protamin gebundenen Analog gemischt, also quasi einem mit einem Insulin-Analogon formulierten NPH-Insulin. Mischinsuline mit unterschiedlichen Analoga (rasch- plus langwirkendes Analogon) sind zwar in Entwicklung [28], bislang scheiterte eine solche Formulierung jedoch an einer (unerwünschten) Interaktion der Analoga, so dass "gemischte" Hexamere mit rasch- und langwirkenden Analoga vorlagen und insbesondere der schnellere Wirkeintritt des raschwirkenden Insulin-Analogons nicht mehr gegeben war. Bislang sind daher nur Insulin Lispro und Insulin Aspart in Mischinsulin-Präparaten (formuliert mit Protamin-gebundenem Insulin Lispro bzw. Insulin Aspart) kommerziell verfügbar. Es gibt verschiedenen Präparate mit unterschiedlichem Verhältnis zwischen Protamin-gebundenem und freiem Insulin-Analog, wobei am häufigsten Präparate mit einem freien Analog-Anteil von 25% (Insulin Lispro) bzw. 30% (Insulin Aspart) eingesetzt werden.

Die pharmakokinetische und pharmakodynamische Wirkung von Insulin-Analoga wurde in zahlreichen Studien, zumeist mittels der Glucose-Clamp-Technik, bei gesunden Probanden, aber auch bei Patienten mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes untersucht. Diese Studien bestätigten den schnelleren Wirkbeginn und die kürzere Wirkdauer der

raschwirkenden Insulin-Analoga [20;21;29-37]. Aufgrund der zinkfreien Formulierung ist der Wirkbeginn von Insulin Glulisin noch um einige Minuten schneller als die der anderen Insulin-Analoga [38-40].

Auch die langwirkenden Insulin-Analoga sind vielfach in Glucose-Clamp-Studien untersucht worden. Dabei bestätigte sich im Vergleich mit NPH-Insulin sowohl für Insulin Glargin [23;41-43] als auch für Insulin Detemir [23;44;45] eine längere Wirkdauer und ein flacheres Wirkprofil. Direkte Vergleiche der Charakteristika der beiden langwirkenden Insulin-Analoga erbrachten widersprüchliche Ergebnisse: In einer Studie zeigte Insulin Detemir eine deutlich kürzere Wirkdauer als Insulin Glargin [46]; dies konnte jedoch in anderen Studien nicht bestätigt werden. Hier zeigten sich bei Patienten mit Typ 1 Diabetes nur geringe Unterschiede in der Wirkdauer [47], bei solchen mit Typ 2 Diabetes waren die Wirkprofile in klinisch relevanten Dosierungen von 0,4 U/kg bzw. 0,8 U/kg quasi identisch [48]. Trotzdem wird Insulin Glargin häufig als das länger wirkende Insulin-Analogon wahrgenommen [49;50].

Schließlich gibt es auch für die mit Insulin Lispro und Insulin Aspart formulierten Mischinsulinpräparate einige Glucose-Clamp-Studien, die den erwarteten, durch das raschwirksame Insulin-Analogon bedingten, schnelleren Wirkbeginn im Vergleich zu humanen Mischinsulinpräparaten belegen [51-54].

Somit sind die Wirkprofile von allen verfügbaren Insulinpräparaten mit Insulin-Analoga sehr gut mittels der Glucose-Clamp-Technik, die allgemein als der "Gold Standard" für die Ermittlung von Wirkprofilen gilt [55], beschrieben. Allerdings wurden diese Wirkprofile fast alle mittels einer Einmal-Applikation der Insulin-Analoga ermittelt. Dies ist jedoch insbesondere für die langwirkenden Insulin-Analoga nicht repräsentativ, da es aufgrund der über 24 Stunden hinausgehenden Wirkdauer bei mehrfacher, einmal täglicher Gabe zu einer (leichten) Akkumulation der Wirkung kommt. Dies wird auch durch die wenigen Glucose-Clamp-Studien belegt, die die Wirkung von Insulin Glargin beziehungsweise Insulin Detemir unter steady-state Bedingungen untersuchen [46;56;57].

Auch bei Mischinsulinen kommt es (bei mehrfach täglicher Gabe) zu einem leichten Anstieg der Insulinkonzentrationen nach mehrfacher Gabe [58].

2. Fragestellung

Basierend auf den in der Einleitung dieser Arbeit dargelegten Überlegungen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei bei Patienten mit Typ 2 Diabetes gebräuchliche Strategien für eine Insulintherapie mittels der Glucose-Clamp-Technik über einen Therapietag (24 Stunden) hinweg charakterisiert. Dabei sollten insbesondere folgende Fragestellungen untersucht werden:

- a) *Kann mit einer dreimal täglichen Gabe eines mit Insulin Aspart formulierten Mischinsulins ein ähnliches Wirkprofil wie bei einer intensivierten Insulintherapie mit einem lang- und einem kurzwirkenden Insulinanalogon erzielt werden?*

Beide Insulin-Regime könnten am Ende einer Intensivierungsphase einer Insulintherapie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes stehen. Die Therapie mit dem Mischinsulin-Präparat hätte gegenüber der intensivierten Insulintherapie den Vorteil, dass nur drei (statt vier) Insulininjektionen erforderlich wären und auch nur ein Insulinpräparat verwendet würde, so dass es nicht zu Verwechslungen der Insulin-Pens bei der Injektion des lang- beziehungsweise raschwirkenden Präparates kommen könnte. Allerdings ist bei Mischinsulinen keine getrennte Anpassung von rasch- und langwirkendem Insulin möglich, und das "langwirkende" (protaminverzögerte) Insulin wird dreimal täglich statt einmal täglich wie bei einer intensivierten Insulintherapie mit einem langwirkenden Insulin-Analogon gegeben. Von daher ist die Frage, ob es über 24 Stunden nicht durch Akkumulation des langwirkenden Basalinsulins zu völlig anderen Wirkprofilen bei beiden Insulin-Regimen kommt, von hoher klinischer Relevanz.

- b) *Kann die Wirkprofil-Charakterisierung von zwei gebräuchlichen Insulintherapiestrategien über einen Therapietag hinweg als Hilfe für den praktischen Einsatz dieser Strategien bei Patienten mit Typ 2 Diabetes im klinischen Alltag dienen?*

Auch wenn die verfügbaren Glucose-Clamp Ergebnisse nach einfacher beziehungsweise mehrfacher Gabe von Insulin-Präparaten sicherlich wertvolle Hinweise für die Durchführung einer Insulintherapie bei Patienten mit Diabetes geben, so ist es doch bei Kombination von mehreren Injektionen z.T. sogar unterschiedlicher Insuline nicht einfach, aus den einzelnen Wirkprofilen ein "Gesamt-Wirkprofil" über 24 Stunden abzuleiten. Bei einer intensivierten Insulintherapie mit einmal täglicher Gabe eines langwirkenden und dreimal täglicher Gabe eines kurzwirkenden Insulin-Analogons kommt es, insbesondere im "Steady-State" nach mehreren Thera-

pietagen, zu deutlichen Überlappungen der einzelnen Wirkprofile, die aus den einzelnen Wirkprofilen nur schwer ableitbar sind. Ähnliches gilt für eine Therapie mit Mischinsulinen, zumindest wenn sie eine mehr als einmal tägliche Gabe eines Mischinsulin-Präparates beinhaltet. Bei Patienten mit Typ 2 Diabetes kommen gegebenenfalls noch Effekte der körpereigenen, endogenen Insulinsekretion hinzu.

3. Probanden, Material und Methoden

3.1 Patienten Ein- und Ausschlusskriterien

24 Patienten mit seit mindestens einem Jahr bestehendem Typ 2 Diabetes sollten in diese Studie eingeschlossen werden. Gemäß den Ein- und Ausschlusskriterien mussten geeignete Patienten seit mindestens 3 Monaten ausschließlich mit Insulin behandelt werden, wobei die tägliche Insulindosis zwischen 0,6 und 0,9 U/kg liegen musste. Eingeschlossen wurden Patienten mit einem Alter von 18 bis 65 Jahren, einem Body Mass Index (Körpergewicht in kg dividiert durch Körpergröße in m zum Quadrat) zwischen 25 und 40 kg/m² und einem HbA1c-Wert zwischen 7,0 und 10,0 %. Ausgeschlossen waren Patienten mit Herz-, Nieren-, oder Leberinsuffizienz oder Erkrankungen, die den Glucose-Stoffwechsel beeinflussen können, mit relevanten Erkrankungen in der Vorgeschichte, Spätfolgekomplikationen des Diabetes oder Blutar- mut. Zudem durften Patienten nicht an häufigen Hypoglykämien bzw. Hypoglykämie- Wahrnehmungsstörungen leiden oder orale Antidiabetika oder andere Medikamente mit Auswirkung auf die Blutglucose-Konzentration einnehmen.

Jeder der Probanden unterschrieb nach ausführlicher Erläuterung der Studie die Einverständniserklärung. Die Durchführung der Studie erfolgte entsprechend der Dekl- aration von Helsinki, gemäß den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft für die Durchführung von klinischen Studien ("Good clinical practice"; GCP) und entspre- chend den Vorschriften der amerikanischen Gesundheitsbehörde ("Federal Drug Ad- ministration"; FDA). Das Studienprotokoll, die Patientenaufklärung und die Einwilli- gungserklärung wurden vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte in Bonn und von der Ethikkommission der Ärztekammer Nordrhein begutachtet und die Durchführung der Studie bewilligt.

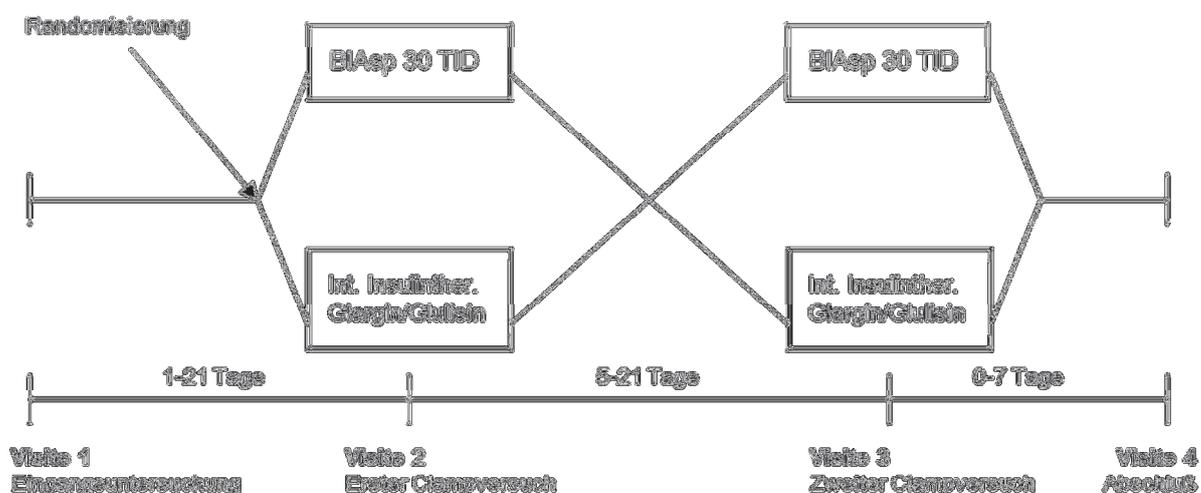
Die Durchführung der Studie erfolgte im Profil Institut für Stoffwechselforschung in Neuss. Die Patienten wurden über die im Institut vorliegende Patientendatenbank re- krutiert. Patienten, die aufgrund der in der Datenbank vorliegenden Informationen zur Studienteilnahme geeignet erschienen, wurden telefonisch kontaktiert und bei prinzi- piellem Interesse an einer Studienteilnahme zu einer Screeningvisite eingeladen, wo die Patienten nach ausführlicher Aufklärung über die Studie durch einen Studienarzt bzw. eine Studienärztin und Beantwortung etwaiger Fragen entscheiden konnten, ob sie an der Studie teilnehmen wollten.

3.2 Studienübersicht

Die Studie wurde als randomisierte, offene, zweifache Crossover Studie durchgeführt. Sie umfasste eine Eingangsuntersuchung (Visite 1), zwei Dosierungsvisiten (Visiten 2 und 3 mit jeweils 2 Übernachtungen und einem ca. 31-stündigen Clamp-versuch) und eine Abschlussuntersuchung (Visite 4). Die Eingangsuntersuchung fand höchstens bis 21 Tage vor dem ersten Versuchstag statt, zwischen den Versuchstagen lagen 5 bis 21 Tage und die Abschlussuntersuchung fand spätestens bis zu 7 Tagen nach dem letzten Versuchstag statt. In zufälliger (randomisierter) Reihenfolge erhielten die Patienten bei einem der Versuchstermine unter Glucose-Clamp-Bedingungen 3 Injektionen des Mischinsulins BIAsp30 (Novomix[®] 30, Novo Nordisk A/S, Kopenhagen, Dänemark), bestehend aus 30% Insulin Aspart und 70% protaminiertem Insulin Aspart. Bei dem anderen Versuchstermin erhielten die Patienten ebenfalls während eines euglykämischen Glucose-Clamp eine Injektion des Basalinsulin-Analogons Insulin Glargin (Lantus[®]) und 3 Injektionen des schnellwirkenden Insulin-Analogons Insulin Glulisin (Apidra[®], jeweils Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt). Aufgrund der unterschiedlichen Injektionsfrequenz bei beiden Visiten wurde eine Verblindung als zu aufwendig erachtet.

Einen Überblick über das Studiendesign und die Studienabläufe gibt das nachfolgende Diagramm.

Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Studie



Die Aktivitäten bei den einzelnen Visiten sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet.
Tabelle 1: Studienaktivitäten bei den einzelnen Visiten

	Eingangsuntersuchung	Dosierungsvisiten			Abschlussuntersuchung
		1	2	3	
Visite					
Abstand zur Vorvisite		1-21 Tage	5-21 Tage		0-7 Tage
Einverständniserklärung	X				
Anamnese, Erhebung der Begleiterkrankungen	X				
Einnahme von Alkohol, Medikamenten und Nikotin	X				
Überprüfung der Ein-/Ausschlusskriterien	X				
Überprüfung der Dosierungs-Ausschlusskriterien		X	X		
Demographie	X				
Körperliche Untersuchung	X				
Größe, Gewicht	X	X ¹	X ¹	X ¹	X ¹
Vitalwerte	X	X ²	X ²	X ²	X
EKG	X				X
Labor: Hämatologie, Biochemie, Gerinnung ³ , Urinstatus	X				X
Hepatitis-, HIV-Serologie	X				
Drogenscreening	X	X ⁴	X ⁴	X ⁴	
Schwangerschaftstest	X ⁵	X ⁶	X ⁶	X ⁶	X ⁶
Randomisierung		X			
Dosierung der Studienmedikation		X ⁷	X ⁷	X ⁷	
Euglykämischer Glucose-Clamp-Versuch (24h nach erster Dosierung)		X	X	X	
Insulin (Humaninsulin, Aspart, Glulisin, Glargin) und C-Peptid-Bestimmungen		X	X	X	
Begleitmedikation	X	X	X	X	X
Unerwünschte Ereignisse		X	X	X	

¹Nur Gewicht

²Vor und 24h nach Dosierung

³Gerinnung wurde nur bei der Eingangsuntersuchung gemessen

⁴Nur Atemalkohol-Test

⁵ß-HCG im Serum

⁶Urin-Schwangerschaftstest

⁷BIAsp30 wurde um 19 Uhr am Vortag des Clamps mit einem Abendessen und während des Clamps um 7, 13 und 19 Uhr gegeben. Bei Randomisierung zur Basis-Bolus-Therapie injizierten die Patienten am Vortag des Clamps ihr übliches Bolus-insulin um 19 Uhr mit einem Abendessen und erhielten Insulin Glargin um 23 Uhr. Während des Glucose-Clamp-Versuchs wurde Insulin Glulisin um 7, 13 und 19 Uhr injiziert, Insulin Glargin noch einmal um 23 Uhr.

Über Nacht wurde die Blutglucose-Konzentration mit Infusionen von Insulin und Glucose stabilisiert. Die Insulininfusion wurde 60 min vor der ersten Dosierung um 7 Uhr abgesetzt, so dass keine Glucose-infusion erforderlich war, und 30 min später gestoppt. Der Clampversuch dauerte bis 24 h nach der ersten Dosierung an.

3.3 Detaillierter Studienablauf

Zur Eingangsuntersuchung (Visite 1) erschien jeder Patient nach nächtlichem Fasten (letzte Nahrungsaufnahme spätestens um 22 Uhr des Vorabends). Nach umfassender Aufklärung insbesondere über mögliche Risiken einer Studienteilnahme erklärten die Patienten schriftlich durch Unterschreiben der Einverständniserklärung ihre Bereitschaft zur Studienteilnahme. Anschließend wurde eine umfassende Anamnese und körperliche Untersuchung durchgeführt sowie Vitalwerte, Körpergröße und -gewicht bestimmt. Es erfolgten Abnahmen von Blut und Urin für Laborbestimmungen (inklusive Hepatitis B und C sowie HIV Serologie, Drogenscreening, Alkoholtest und bei Frauen Schwangerschaftstest) und die Durchführung eines EKGs.

Am ersten Tag der Dosierungsvisiten (Tag -1) kamen die Patienten mittags gegen 12.30 Uhr in das Forschungsinstitut. Nach Bestimmung des aktuellen Körpergewichts wurden die Dosierungs-Ausschlusskriterien abgefragt: Die Patienten mussten mindestens 48 Stunden vor den Dosierungsvisiten auf körperliche Anstrengung und 24 Stunden vorher auf Kaffee, Tee, andere anregende Getränke sowie Alkohol verzichten haben. Außerdem durfte das eigene Basalinsulin nicht später als bis 22 Uhr am Vortag des Beginns des Klinikaufenthaltes injiziert werden. Bei Patienten, die diese Vorgaben nicht einhielten, und bei Patienten mit einer Unterzuckerung in der Nacht vor der Dosierungsvisite sowie bei Patienten mit akuten Erkrankungen oder Änderungen in der Begleitmedikation hätte eine Verschiebung der Dosierungsvisite um 1-14 Tage erfolgen müssen, wobei maximal 2 Verschiebungen pro Patient zulässig gewesen wären. Eine Verletzung der Dosierungs-Ausschlusskriterien kam jedoch in dieser Studie nicht vor.

Bei der ersten Dosierungsvisite (Visite 2) wurden geeignete Patienten zu einer Behandlungssequenz (entweder zunächst BIAsp30, dann Insulin Glargin/Insulin Glulisin oder umgekehrte Reihenfolge) randomisiert. Die Randomisierungsnummer wurde bei 101 begonnen und in aufsteigender Nummer vergeben. Nach Randomisierung erhielten die Probanden um 13 Uhr ein Standardmittagessen, zu dem sie ihr eigenes, kurzwirksames Insulin spritzten. Um 19 Uhr verzehrten die Patienten dann ein Standardabendessen. Zu diesem Essen injizierten die Patienten bei entsprechender Randomisierung entweder BIAsp30 oder (bei Randomisierung zu Insulin Glargin/Insulin Glulisin) erneut ihr eigenes kurzwirksames Insulin. Bei Randomisierung zu Insulin Glargin/Insulin Glulisin wurde dann um 23 Uhr die erste Injektion der Studienmedikation (Insulin Glargin) gegeben.

Gegen Mitternacht wurden die Patienten an einen Biostator (glucose controlled insulin infusionsystem, Life Sciences Instruments, MTB Medizintechnik, Ulm) angeschlossen (siehe

3.5 Der euglykämische Glucose-Clamp-Versuch). Über Nacht, bis gegen 7 Uhr morgens wurde die Blutglucose-Konzentration der Patienten auf ein Niveau von 5 mmol (90 mg/dl) gebracht. Dazu wurde Humaninsulin (Actrapid[®], Novo Nordisk A/S, Kopenhagen, Dänemark) in einer variablen Rate (angepasst an die aktuelle Blutglucose-Konzentration, mindestens 0,1ml/h) mittels eines Perfusors (Spritzenpumpe Terufusion TE 311; Terumo Corporation, Tokio, Japan) und 20%-Glucoselösung intravenös infundiert. Die Insulin-Infusionsrate wurde gegen 6 Uhr, 60 Minuten vor der morgendlichen Dosierung der Studienmedikation, so weit abgesenkt, dass keine Glucoseinfusion mehr erforderlich war, und 30 Minuten vor der morgendlichen Dosierung der Studienmedikation vollständig beendet.

Gegen 7 Uhr morgens fand die Dosierung der Studienmedikation (entweder BIAsp30 oder Insulin Glulisin) statt. Die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Effekte der verabreichten Insuline wurden anschließend mittels der euglykämischen Glucose Clamp-Technik und von regelmäßigen Blutabnahmen über die folgenden 24 Stunden gemessen.

Während des Glucose-Clamp-Versuches erfolgten weitere Insulin-Injektionen gegen 13 Uhr (6 Stunden nach der morgendlichen Dosierung, Insulin Glulisin bei Randomisierung zur intensivierten Insulintherapie oder BIAsp30 bei Randomisierung zum Mischinsulin), gegen 19 Uhr (12 Stunden nach der morgendlichen Dosierung (entweder Insulin Glulisin oder BIAsp30) und gegen 23 Uhr (16 Stunden nach der morgendlichen Dosierung, Insulin Glargin bei Randomisierung zur intensivierten Insulintherapie).

Nach Beenden des Clampversuchs erhielten die Probanden an Tag 2 ein Frühstück und konnten, sofern keine Sicherheitsbedenken bestanden, das Forschungsinstitut wieder verlassen.

Nach einer Wash-out Periode von 5-13 Tagen kamen die Patienten zur zweiten Dosierungsvisite (Visite 3) erneut in das Forschungsinstitut. Der Ablauf war identisch zur ersten Dosierungsvisite, es wurde jedoch im Cross-over Verfahren die andere Studienmedikation gegeben (das heisst, Patienten, die bei der ersten Dosierungsvisite BIAsp30 erhalten hatten, erhielten dann die intensivierte Insulintherapie mit Insulin Glargin und Insulin Glulisin, und umgekehrt).

Vor und nach jedem Clampversuch und auch während der stationären Aufenthalte wurden die Patienten mehrfach nach unerwünschten Ereignissen gefragt. Bei Auftreten solcher Ereignisse wurden Symptome, Beginn und Ende sowie gegebenenfalls Therapiemassnahmen sorgfältig in den Studienunterlagen dokumentiert.

Bis zu 7 Tage nach der zweiten Dosierungsvisite wurde eine Abschlussuntersuchung (Visite 4) durchgeführt, zu der die Patienten nüchtern erschienen. Sie wurden nach unerwünschten Ereignissen und zusätzlich eingenommenen Medikamenten befragt, und es wurden Sicherheitslaborwerte (bei Frauen inklusive eines Schwangerschaftstestes) sowie Vitalzeichen, EKG und Gewicht bestimmt. Anschließend konnten die

Patienten das Forschungsinstitut wieder verlassen und damit die Studienteilnahme beenden. Insgesamt betrug der Blutverlust für einen Patienten durch die Studienmaßnahmen circa 380 ml.

3.4 Studienmedikation

Die Patienten erhielten im Cross-over Verfahren folgende Studienmedikation: Bei einer Dosierungsvisite erhielten die Patienten insgesamt 4 Injektionen des Mischinsulins BIAsp30 (Novomix® 30, Novo Nordisk A/S, Kopenhagen, Dänemark), das zu 30% aus Insulin Aspart und 70% aus Insulin Aspart-Protamin-Kristallen besteht. Bei der anderen Dosierungsvisite wurde der Effekt einer intensivierten Insulintherapie mit Insulinanaloga untersucht. Die Patienten erhielten 2 Injektion von Insulin Glargin und 3 Injektionen von Insulin Glulisin. Die erste Injektion der Studienmedikation wurde am Vorabend des Glucose-Clamp-Versuches gegeben (entweder BIAsp30 um 19 Uhr oder Insulin Glargin um 23 Uhr). Dies diente der Simulation von Steady-state-Bedingungen, es wurde also erwartet, dass der Effekt dieser Insuline beim Beginn des Glucose-Clamps um 7 Uhr morgens noch anhielt.

Die Insulindosis wurde individuell für jeden Patienten festgelegt, in dem bei der Eingangsuntersuchung anamnestisch die Insulin-Tagesdosis jedes Patienten erhoben wurde. Diese Tagesdosis (in Einheiten (U) pro kg Körpergewicht in 24 Stunden) wurde dann während der Glucose-Clamp-Versuche verabreicht, aufgeteilt auf die verschiedenen Injektionen. Bei der Therapie mit BIAsp30 wurde jeweils 40% der Insulintagesdosis morgens um 7 Uhr und abends 19 Uhr verabreicht, sowie 20% mittags um 13 Uhr. Bei der intensivierten Insulintherapie entfiel 60% der Tagesdosis auf Insulin Glargin, verabreicht um 23 Uhr. Die verbleibenden 40% wurden gleichmäßig auf die 3 Injektionen von Insulin Glulisin aufgeteilt, so dass um 7, 13 und 19 Uhr jeweils 13,3% der Tagesdosis verabreicht wurden. Die Dosis der Injektionen von BIAsp30 und Insulin Glargin am Vorabend der Glucose-Clamp-Versuche entsprachen der bei den Versuchen verabreichten Dosis: BIAsp30 wurde also in einer Dosis von 40% der Tagesdosis verabreicht, bei Insulin Glargin waren es 60%. Als Grundlage der Berechnung diente das Körpergewicht zu Beginn des ersten stationären Aufenthalts (Visite 2).

Alle Injektionen wurde subkutan in das abdominelle Unterhautfettgewebe periumbilikal verabreicht, wobei alternierend die linke und die rechte Seite benutzt wurde. BIAsp30 wurde mittels eines Insulinpens (Flexpen®, Novo Nordisk A/S, Kopenhagen, Dänemark) injiziert, Insulin Glargin und Insulin Glulisin mittels Insulin-Spritzen (Micro Fine 0,3 ml, Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die Injektionsstellen wurden markiert, um gegebenenfalls lokale Veränderungen der Einstichstellen erfassen zu können. Alle Insuline wurden eine Stunde vor Dosierung aus dem Kühlschrank entnommen, um sie auf Umgebungstemperatur zu erwärmen.

3.5 Der euglykämische Glucose-Clamp-Versuch

Zur Ermittlung der Wirkprofile (also der blutzuckersenkenden Wirkung über die Zeit) der Studienmedikation wurde die euglykämische, hyperinsulinämische Glucose-Clamp-technik eingesetzt, die als goldener Standard für die Ermittlung von Wirkprofilen gilt [55] und auch von den europäischen Zulassungsbehörden für diese Zwecke gefordert wird (<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/ewp/108000enrev1.pdf>, Zugriff vom 9.6.2010).

Dabei wird der Blutzucker auf einem vorgegebenen euglykämischen Wert "fixiert" (engl. to clamp = festklemmen, fixieren), also weitgehend konstant gehalten, indem die blutzuckersenkende Wirkung der Studienmedikation durch eine variable Glucose-infusion antagonisiert wird. Die Glucose-infusionsrate, die zur Konstanthaltung der Blutglucose erforderlich ist, ist somit ein indirektes Maß für die blutglucosesenkende Wirkung der Studienmedikation, die (im Gegensatz zu einer direkten Messung der Wirkung auf die Blutglucose) unabhängig von einer (z.B. bei Hypoglykämien auftretenden) Gegenregulation mit der Ausschüttung kontra-insulinärer Hormone wie Cortisol, Katecholamine, Glucagon und Wachstumshormon ist [55;60].

In der hier präsentierten Studie wurde eine automatisierte Glucose-Clamp-technik unter Einsatz einer "künstlichen Bauchspeicheldrüse", eines sogenannten Biostators (Glucose Controlled Insulin Infusion System GCIIS; Life Science Instruments, MTB Medizintechnik, Ulm) angewendet. Dabei wird durch einen in den Biostator integrierten Glucose-Sensor eine kontinuierliche Blutglucose-messung vorgenommen und minütlich auf Grundlage dieser Glucose-messung automatisch die zur Aufrechterhaltung der Euglykämie notwendigen Glucose-infusionsrate errechnet und intravenös infundiert.

Die Patienten wurden, nachdem sie als letzte Mahlzeit ein standardisiertes Abendessen zu sich genommen hatten, gegen Mitternacht, also circa 7 Stunden vor der Administration der morgendlichen Dosierung der Studienmedikation, an den Biostator angeschlossen. Dazu wurde retrograd eine Kanüle in eine Vene am Handrücken oder am Handgelenk gelegt, in die ein Doppellumen-Katheter gelegt wurde. Durch ein Lumen wurde eine niedrig-dosierte Heparinlösung (10.000 Einheiten Heparin in 100 ml physiologischer NaCl-Lösung) infundiert, die dann zusammen mit Blut des Patienten in dem anderen Lumen zum Glucose-Sensor des Biostators transportiert wurde (und ein Gerinnen des Blutes im System verhindern sollte). Um eine möglichst stabile Glucose-messung zu erhalten, erfolgte die Messung im arterialisierten Blut, indem die betroffene Hand in einer sogenannten Hot-Box oder mittels einer Heizdecke einer Umgebungstemperatur von 55°C ausgesetzt wurde [61;62] (bei dieser Temperatur öffnen sich reflektorisch arterio-venöse Shunt-verbindungen).

Eine zweite Kanüle wurde in einer Antecubital-Vene desselben Armes platziert, aus der regelmäßig Blutproben zur Bestimmung von Blutglucose und Seruminsulin-

konzentrationen (erlaubt Aussagen zur Pharmakokinetik) sowie von Serum-C-Peptid (erlaubt Aussagen über die noch vorhandene/stimulierte endogene Insulin-Produktion) abgenommen wurden. Diese Kanüle wurde durch eine langsame Infusion von 0,9% NaCl-Lösung offen gehalten. Eine dritte Kanüle wurde am kontra-lateralen Arm für die Infusion von Insulin und Glucose gelegt.

Die Blutglucose-Konzentration der Patienten wurde über Nacht mit Hilfe von variablen, intravenösen Infusionen von Insulin und Glucose auf 90 mg/dl abgesenkt. Insulin (15 IU Actrapid® (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dänemark) auf 49 ml 0,9% NaCl-Lösung plus 1 ml patienteneigenes Blut zur Verhinderung einer Anhaftung des Insulins an die Infusionsmaterialien) wurde mit Hilfe einer Spritzenpumpe (Spritzenpumpe Terufusion TE*311NH3, Terumo Corporation, Tokyo, Japan) infundiert, wobei bis 3 Stunden vor Gabe der Studienmedikation auch intravenöse Bolusgaben erlaubt waren. In der letzten Stunde vor Dosierung wurde die Insulin-infusionsrate so weit abgesenkt, dass keine Glucose-infusion mehr notwendig war. 30 Minuten vor Dosierung wurde die Insulininfusion gestoppt.

Die morgendliche Dosierung der Studienmedikation gegen 7 Uhr wurde als Startzeitpunkt des Glucose-Clamps definiert (Zeitpunkt 0 min). Die Glucose-Konzentration der Patienten wurde in den nachfolgenden 24 Stunden durch intravenöse Infusion einer 20%-Glucose-lösung auf einem Zielwert von 90 mg/dl konstant gehalten. Der Biostator berechnete und infundierte automatisch jede Minute die notwendige Glucose-infusionsrate (GIR) unter Anwendung eines Algorithmus, der die zuletzt gemessene Blutglucose-konzentration und die Glucose-Schwankungen in den vorhergehenden 5 Minuten berücksichtigte. Falls hohe Glucoseinfusionsraten notwendig wurden, wurde ein Teil der Infusion über eine Infusionspumpe (Infusionspumpe Midpress TE*171CW3, Terumo Corporation, Tokyo, Japan) verabreicht. Die über die Infusionspumpe verabreichte Glucose-infusionsrate wurde bei der Auswertung der Glucose-Clamp-versuche zu der vom Biostator gegebenen Glucose-Infusion hinzu addiert. Der Biostator wurde bei den Versuchen im Glucose-Clamp-Modus (Mode 9:1) mit einem KS-Wert (einer Biostator-internen Konstante) von 1,0 betrieben.

Die Blutglucose-Messungen des Biostators wurden regelmäßig (mindestens alle 30 Minuten) mittels auf einem Laborgerät (Super GL Glucose Analyzer, Hitado Diagnostic Systems GmbH, Möhnesee-Delecke, Deutschland) durchgeführten Blutzuckermessungen überprüft und gegebenenfalls angepasst.

Blutproben wurden regelmäßig nach folgendem Verfahren abgenommen: Die Infusion der physiologischen NaCl-Lösung wurde gestoppt und 2 ml (verdünntes) Blut wurde aus der Infusionsleitung mit Hilfe einer Spritze über einen Dreiwegehahn abgenommen. Über einen zweiten, distal gelegenen Dreiwegehahn wurde anschließend die benötigte Blutmenge abgenommen. Das verdünnte Blut in der ersten Spritze wurde anschließend re-infundiert und die Infusion der physiologischen NaCl-Lösung erneut gestartet.

Die genauen Abnahmezeitpunkte sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet:

Tabelle 2: Blutabnahmezeitpunkte bei den Versuchen mit BIAsp30

Ungefähre Uhrzeit	Nominal-Zeit h min	Aktivität	Insulin- aspart	Human- insulin	C- Peptid	Blutglucose (Biostator- Kalibration)
19:00Tag -1	. - 720	Injektion von BIAsp30				
00:00Tag 1	- 420	Anschluß an Bio- stator				Blutabnahme mindestens alle 30 min
	- 30		X	X		
	- 15		X	X		
07:00Tag 1	0	BIAsp30	X	X	X	
	0 15		X			
	0 30		X			
	0 40		X			
	0 50		X			
	1		X			
	1 10		X			
	1 20		X			
	1 30		X			
	1 40		X			
	1 50		X			
	2		X			
	2 15		X			
	2 30		X			
	3		X	X	X	
	3 30		X			
	4		X			
	5		X			
13:00Tag 1	6	BIAsp30	X	X	X	
	6 15		X			
	6 30		X			
	6 40		X			
	6 50		X			
	7		X			
	7 10		X			
	7 20		X			
	7 30		X			
	7 40		X			
	7 50		X			
	8		X			
	8 15		X			
	8 30		X			
	9		X	X	X	
	9 30		X			
	10		X			
	11		X			
19:00Tag 1	12	BIAsp30	X	X	X	
	12 15		X			
	12 30		X			
	12 40		X			
	12 50		X			

Ungefähre Uhrzeit	Nominal-Zeit h min	Aktivität	Insulin- aspart	Human- insulin	C- Peptid	Blutglucose (Biostator- Kalibration)
	13		X			
	13 10		X			
	13 20		X			
	13 30		X			
	13 40		X			
	13 50		X			
	14		X			
	14 15		X			
	14 30		X			
	15		X	X	X	
	15 30		X			
23:00Tag 1	16		X			
	17		X			
	18		X	X	X	
	19					
	20		X			
	21			X	X	
	22		X			
	23					
07:00Tag 2	24	Clamp-Ende	X	X	X	

Tabelle 3: Blutabnahmezeitpunkte bei den Versuchen mit intensivierter Insulintherapie

Ungefähre Uhrzeit	Nominal-Zeit h min	Aktivität	Insulin Glargin	Insulin glulisin	Human-insulin	C-Peptid	Blutglucose (Biostator-Kalibration)
23:00Tag -1	- 480	Insulin Glargin					Blutabnahme mindestens alle 30min
00:00 Tag 1	- 420	Anschluß an Biostator					
	- 30		X	X	X		
	- 15			X	X		
07:00Tag 1	0	Insulin Glulisin	X	X	X	X	
	0 15			X			
	0 30			X			
	0 40			X			
	0 50			X			
	1		X	X			
	1 10			X			
	1 20			X			
	1 30			X			
	1 40			X			
	1 50			X			
	2		X	X			
	2 15			X			
	2 30			X			
	3		X	X	X	X	
	3 30			X			
	4		X	X			
	5		X	X			
13:00Tag 1	6	Insulin Glulisin	X	X	X	X	
	6 15			X			
	6 30			X			
	6 40			X			
	6 50			X			
	7		X	X			
	7 10			X			
	7 20			X			
	7 30			X			
	7 40			X			
	7 50			X			
	8		X	X			
	8 15			X			
	8 30			X			
	9		X	X	X	X	
	9 30			X			
	10		X	X			
	11		X	X			
19:00Tag 1	12	Insulin Glulisin	X	X	X	X	
	12 15			X			
	12 30			X			
	12 40			X			
	12 50			X			
	13		X	X			
	13 10			X			
	13 20			X			

Ungefähre Uhrzeit	Nominal-Zeit h min	Aktivität	Insulin Glargin	Insulin glulisin	Human-insulin	C-Peptid	Blutglucose (Biostator-Kalibration)
	13 30			X			
	13 40			X			
	13 50			X			
	14		X	X			
	14 15			X			
	14 30			X			
	15		X	X	X	X	
	15 30			X			
23:00Tag 1	16	Insulin Glargin	X	X			
	17		X	X			
	18		X	X	X	X	
	19		X				
	20		X	X			
	21		X		X	X	
	22		X	X			
	23		X				
07:00Tag 2	24	Clamp-Ende	X	X	X	X	

Während des gesamten Glucose-Clamp-Versuches blieb der Patient im Bett und nahm (außer Mineralwasser) keine Nahrung zu sich. Nach Clamp-Ende (am Morgen von Tag 2) wurden alle Infusionsschläuche und Kanülen von den Patienten entfernt. Die Patienten erhielten ein Frühstück und injizierten dazu ein kurzwirksames Insulin-analogon in einer mit dem Prüfarzt abgesprochenen, individuellen Dosis.

3.6 Bestimmungsmethoden

Die Konzentration von Insulin Aspart wurde mittels validiertem, spezifischem Sandwich Elisa Assay bestimmt (CapioDiagnostic A/S, Kopenhagen, Dänemark). Insulin Glargin wurde mittels eines spezifischen Sandwich-Assays in humanem Heparinplasma bestimmt, der auch die metabolisch aktiven Metabolite von Insulin Glargin erfasst (Novo Nordisk A/S, Malov, Dänemark). Die Plasma-Konzentrationen von Humaninsulin und Serum-C-Peptid wurden mittels validierter und spezifischer Sandwich Assay bestimmt (CapioDiagnostic A/S, Kopenhagen, Dänemark). Vorgesehen war auch die Bestimmung von Insulin Glulisin mittels eines spezifischen Assays. Es stellte sich jedoch heraus, dass kein spezifischer Assay kommerziell verfügbar war. Daraufhin wurde auf die Bestimmung der Insulin Glulisin-Konzentrationen (und der zugehörigen Endpunkte) verzichtet.

3.7 Zielparameter und statistische Auswertung

3.7.1 Fallzahlabeschätzung

Eine formelle statistische Fallzahlabeschätzung wurde nicht durchgeführt, da im Vordergrund die Charakterisierung der Gesamt-Wirkprofile beider Studienmedikationen stand, und statistische Vergleiche eher sekundärer Natur waren.

Aufgrund der Daten einer vorherigen Studie [63] konnte davon ausgegangen werden, dass die maximale Glucose-infusionsrate GIR_{max} mit einem 95%-Konfidenzintervall von ca. 12-14% abgeschätzt werden kann, wenn 20 Patienten die Studie beenden. Dies wurde als ausreichend präzise für die Charakterisierung der pharmakodynamischen Wirkung erachtet. In die Studie wurden 24 Patienten eingeschlossen, um sicher zu sein, dass mindestens 20 Patienten die Studie beenden.

3.7.2 Statistische Methodik

Die pharmakodynamischen Parameter wurden anhand der Glucose-infusionsraten (GIR) berechnet. Die pharmakokinetischen Endpunkte wurden aus den gemessenen Plasma-Konzentrationen von Insulin Glargin und Insulin Aspart bestimmt.

Primäres Ziel der Studie war die Charakterisierung der pharmakodynamischen Profile eines Behandlungstags mit drei Injektionen von BIAsp30 bzw. einer intensivierten Insulintherapie mit Insulin Glulisin und Insulin Glargin. Diese Charakterisierung erfolgte anhand der GIR-Profile und der folgenden primären pharmakodynamischen Endpunkte:

- Gesamte Fläche unter der Kurve (area under the curve - AUC) der GIR-Profile über 24 Stunden ($AUC_{GIR\ 0-24h}$)
- Fläche unter der GIR-Kurve über 4 Stunden nach jeder Injektion von Insulin Glulisin bzw. BIAsp30 ($AUC_{GIR\ 0-4h}$)
- Maximale GIR nach jeder Injektion von Insulin Glulisin bzw. BIAsp30 (GIR_{max})
- Zeit bis zum Erreichen von GIR_{max} nach jeder Injektion von Insulin Glulisin beziehungsweise BIAsp30 (t_{GIRmax})

Sekundäre pharmakodynamische Endpunkte waren:

- Fläche unter der GIR-Kurve über 2 Stunden nach jeder Injektion von Insulin Glulisin bzw. BIAsp30 ($AUC_{GIR\ 0-2h}$)
- Fläche unter der GIR-Kurve über 6 Stunden nach jeder Injektion von Insulin Glulisin bzw. BIAsp30 ($AUC_{GIR\ 0-6h}$)
- Fläche unter der GIR-Kurve über 12 Stunden nach der ersten Dosierung der Studienmedikation während des Glucose-Clamp-Versuches, das heisst nach der morgendlichen Gabe von Insulin Glulisin bzw. BIAsp30 ($AUC_{GIR\ 0-12h}$)

- Fläche unter der GIR-Kurve von 12 bis 24 Stunden nach der ersten Dosierung der Studienmedikation während des Glucose-Clamp-Versuches, das heisst nach der morgendlichen Gabe von Insulin Glulisin bzw. BIAsp30 ($AUC_{GIR\ 12-24h}$)

Sekundäre pharmakokinetische Endpunkte waren:

- Gesamte Fläche unter der Kurve der Insulin(INS)-Profile über 24 Stunden ($AUC_{INS\ 0-24h}$) für Insulin Glargin und BIAsp30
- Fläche unter der Kurve der Insulin-Profile über 2 Stunden ($AUC_{INS\ 0-2h}$) nach jeder Injektion von BIAsp30
- Fläche unter der Kurve der Insulin-Profile über 4 Stunden ($AUC_{INS\ 0-4h}$) nach jeder Injektion von BIAsp30
- Fläche unter der Kurve der Insulin-Profile über 6 Stunden ($AUC_{INS\ 0-6h}$) nach jeder Injektion von BIAsp30
- Fläche unter der Kurve der Insulin-Profile von 12 bis 24 Stunden ($AUC_{INS\ 12-24h}$) nach der ersten Dosierung der Studienmedikation während des Glucose-Clamp-Versuches, d.h. nach der morgendlichen Gabe von Insulin Glulisin bzw. BIAsp30
- Maximale Insulin-Konzentration nach jeder Insulininjektion (C_{INSmax})
- Zeit zum Erreichen von C_{max} nach jeder Insulininjektion (t_{INSmax})

Bei Beginn der Studiendurchführung war auch eine Bestimmung sämtlicher pharmakokinetischer Endpunkte aus den Insulin Glulisin-Konzentrationskurven vorgesehen. Diese musste dann jedoch aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit eines kommerziellen Assay entfallen, so dass ein Vergleich der pharmakokinetischen Profile zwischen den beiden Behandlungsarmen (BIAsp30 beziehungsweise intensivierete Insulintherapie) nicht möglich war. In der vorliegenden Arbeit werden daher die pharmakokinetischen Analysen nur der Vollständigkeit halber aufgelistet; der Schwerpunkt liegt aber auf den pharmakodynamischen Ergebnissen.

Die Sicherheitsendpunkte dieser Studie waren:

- Unerwünschte Ereignisse (Adverse events)
- Laborparameter (Hämatologie, Biochemie und Urin-Status)
- Vitalwerte (Blutdruck, Puls und Körper-Temperatur)
- Körperliche Untersuchung
- Körpergewicht
- EKG

3.7.2 Analyse der pharmakodynamischen Endpunkte

Da die Original-GIR-Profile, bedingt durch die vom Biostator-Algorithmus induzierten Schwingungen der Blutglucose um den Zielwert, erhebliche Fluktuationen aufweisen, wurden sie mittels einer Regressionstechnik (gewichtete lokale Regression (LOESS))

geglättet. Die Flächen unter den (geglätteten) GIR-Kurven wurden mittels der Trapezregel bestimmt. Auch die Parameter GIR_{max} und t_{GIRmax} wurden aus den geglätteten GIR-Profilen bestimmt.

Auch die Flächen unter den Insulinprofilen wurden mittels der Trapezregel bestimmt. Die Insulinprofile wurden nicht geglättet, so dass C_{max} als die maximale Insulinkonzentration eines Profils definiert war und t_{max} als der dazu gehörige Zeitpunkt. Da die verwendeten Assays spezifisch für die gemessenen Insulin-Analoga waren, wurde keine Korrektur für Baseline-Werte durchgeführt.

Alle Endpunkte werden mittels deskriptiver Statistik zusammengefaßt. Sofern nicht anders angegeben, werden die Werte im Text als Mittelwert \pm Standardabweichung und in den Abbildungen als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Da das primäre Ziel dieser Studie die Charakterisierung der Wirkprofile waren, wurden keine statistischen Vergleiche zwischen den beiden Behandlungen (BIAsp30 und intensivierete Insulintherapie) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Patienten-Charakteristika

Insgesamt nahmen 36 Patienten an der Aufnahmeuntersuchung teil, von denen 24 randomisiert wurden und 23 Patienten die Studie beendeten. Elf Patienten erfüllten die Ein-/Ausschlusskriterien nicht und waren daher sogenannte Screening Failures. Ein Patient erfüllte zwar die Ein-/Ausschlusskriterien, zog aber seine Einverständnis zur Studienteilnahme vor der Randomisierung zurück. Ein weiterer Patient (Screening-Nr. 02) nahm an Visite 2 teil und erhielt die erste Injektion der Studienmedikation (BIAsp30), jedoch konnte der Clamp wegen schlechter Venenverhältnisse nicht begonnen werden. Die Visite wurde auf einen neuen Termin verschoben, jedoch entwickelte der Patient eine fiebrige Erkältung am Vorabend, die schließlich eine stationäre Behandlung erforderte. Der Patient zog darauf sein Einverständnis zur Studienteilnahme zurück. Die Daten der übrigen 23 Patienten, die die Studie beendeten, gingen in die Auswertung mit ein. Im Rahmen eines Datenreview-Meeting vor der Entblindung und Auswertung wurden einige Daten aus der Auswertung ausgeschlossen (siehe Kapitel 3.2).

Die Charakteristika der 24 randomisierten Patienten sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 4: Deskriptive Angaben zu den 24 randomisierten Patienten

Screening-Nr	Alter (Jahre)	Geschlecht	Ethnische Gruppe	Größe (m)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m ²)	Insulindosis ((I)U/Tag)
1	40	M	Kaukasisch	1,80	93,70	28,92	58
2	64	M	Kaukasisch	1,69	108,70	38,06	
4	55	M	Kaukasisch	1,81	116,90	35,68	76
5	53	M	Kaukasisch	1,81	120,40	36,75	73
6	60	M	Kaukasisch	1,81	105,20	32,11	94
7	51	M	Kaukasisch	1,73	94,00	31,41	56
10	51	F	Kaukasisch	1,64	68,80	25,58	50
11	52	M	Kaukasisch	1,78	95,00	29,98	78
12	64	M	Kaukasisch	1,73	92,00	30,74	63
13	52	M	Kaukasisch	1,87	112,90	32,29	71
15	65	M	Kaukasisch	1,81	94,40	28,81	80
17	42	M	Kaukasisch	1,78	112,80	35,60	68
20	52	M	Kaukasisch	1,78	93,50	29,51	84
21	56	M	Kaukasisch	1,65	104,00	38,20	90
23	51	M	Kaukasisch	1,81	126,00	38,46	76
24	34	F	Kaukasisch	1,69	102,70	35,96	82
28	52	M	Kaukasisch	1,83	92,10	27,50	56
29	63	M	Kaukasisch	1,80	78,80	24,32	70
30	52	M	Kaukasisch	1,85	118,00	34,48	75
32	48	M	Kaukasisch	1,89	109,30	30,60	71
33	50	M	Kaukasisch	1,78	100,50	31,72	74
34	55	M	Kaukasisch	1,74	101,40	33,49	86
35	45	F	Kaukasisch	1,60	72,00	28,12	64
36	50	M	Kaukasisch	1,78	85,80	27,08	70
Mittelwert	52,4			1,77	99,95	31,89	72,4
SD	7,6			0,07	14,68	4,08	11,2

Der HbA1c Wert sollte zwischen 7% und 10,5% zum Studienbeginn liegen.

Ein Typ 2 Diabetes musste seit mindestens 12 Monaten diagnostiziert sein und seit mindestens 3 Monaten mit Insulin behandelt worden sein.

4.2 Datenauswertung

Alle 24 Patienten, die die Studienmedikation erhielten, wurden in die Analyse der Sicherheitsparameter eingeschlossen. Der Patient mit der Screening-Nummer 02 wurde jedoch aus der Auswertung der pharmakokinetischen und pharmako-dynamischen Daten ausgeschlossen, da er nur eine Gabe der Studienmedikation (BIAsp30 am Abend vor Beginn des eigentlichen Clamps) erhalten hatte.

Alle Insulin- und GIR-Profile wurde vor dem Schließen der Studiendatenbank in verblindeter Form daraufhin beurteilt, ob sie in die Auswertung der pharmakokinetischen und -dynamischen Endpunkte eingeschlossen werden konnten. Dabei wurde beschlossen, bei dem Patienten mit der Screening-Nummer 34 das PK- und das PD-Profil nach Mischinsulin-Gabe nicht in die Auswertung mit einzubeziehen, da weder

ein Anstieg der Insulin Aspart-Konzentrationen noch der Glucose-infusionsraten nach 12 Uhr (dem vorgesehenen Zeitpunkt der zweiten BAsp30-Gabe) zu sehen war. Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese zweite BAsp30-Injektion beim Clamp-versuch versehentlich nicht erfolgte. Darüber hinaus wurden einige Profile aus der Analyse der maximalen Insulinkonzentration C_{INSmax} und des Zeitpunkt der maximalen Insulinkonzentration t_{INSmax} ausgeschlossen, da um den mutmaßlichen Zeitpunkt der maximalen Insulinkonzentration die Proben hämolytisch waren und somit die gemessenen Insulinkonzentrationen zu niedrig gemessen werden. Dies betraf die Patienten mit den Screening-Nummern 13 (Visite 2) und 21 (Visite 3) jeweils nach der ersten Insulininjektion sowie jeweils nach der dritten Injektion die Patienten mit den Screening-Nummern 6 (Visite 2), 7 (Visite 2), 10 (Visite 3) und 20 (Visite 3). Da die Auswertung der pharmakokinetischen Profile bei dieser Studie nur eine untergeordnete Rolle spielte, hatte der Ausschluss dieser Profile von den pharmakokinetischen Endpunkten C_{INSmax} und t_{INSmax} keinen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie.

Für alle Patienten wurden die C-Peptidprofile in verblindeter Form dahingehend analysiert, ob ein wesentlicher Anstieg über die Basalwerte vor Dosierung erfolgten. Ein Beispiel für ein solches C-Peptidprofil findet sich im Anhang dieser Arbeit. Ein C-Peptid-Anstieg hätte auf eine Stimulation der endogenen Insulinsekretion durch die infundierte Glucose hingewiesen, was eine Beurteilung der pharmakodynamischen Wirkung des exogen zugeführten Insulins (also der Studienmedikation) bei dem betroffenen Versuch unmöglich gemacht hätte. Versuche mit einem nennenswerten Anstieg des C-Peptids wären daher von der Auswertung ausgeschlossen worden; dies trat jedoch bei keinem Versuch auf. Eine darüber hinaus gehende Auswertung der C-Peptid-Daten erfolgte im Rahmen dieser Studie nicht.

4.3 Pharmakodynamik: Glucoseinfusionsraten

4.3.1 Primäre pharmakodynamische Endpunkte

Hauptziel dieser Studie war die Charakterisierung der Gesamt (24h)-Wirkprofile einer Mischinsulin-Therapie mit dreimaliger Gabe von BAsp30 und einer intensivierten Insulintherapie mit einer Einmalgabe von Insulin Glargin und dreimaliger Gabe von Insulin Glulisin. Wie erwartet stiegen die Glucose-infusionsraten nach jeder Gabe von Insulin Glulisin bzw. BAsp30 aufgrund der Wirkung des kurzwirksamen Insulins deutlich an, während die Wirkung des Basalinsulins (Insulin Glargin bzw. des protaminieren Insulin Asparts) weniger stark sichtbar ist. Die mittleren Wirkprofile sind in Abbildung 1 dargestellt, im Anhang finden sich zudem die individuellen Profile aller Patienten. Im Mittel zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede nach den ersten beiden Injektionen von BAsp30 bzw. Insulin Glulisin am Morgen und mittags. Nach der abendlichen Gabe der Insuline stieg die Wirkung jedoch bei der Mischinsulin-therapie

mit BIAsp30 stärker an als nach der dritten Gabe von Insulin Glulisin und führte zu einem höheren Wirkmaximum. Nach Erreichen des Maximums fiel die Wirkung dann bei beiden Insulintherapieformen wieder ab, jedoch unter BIAsp30 etwas schneller. Zum Zeitpunkt 22 Stunden (also circa gegen 5 Uhr morgens) trafen sich die beiden Wirkprofile dann wieder, so dass nach 24 Stunden, also um 7 Uhr (wenn unter Realbedingungen die nächste Insulingabe erfolgt wäre), wieder eine vergleichbare Wirkung vorlag.

Die stärkere Wirkung nach der dritten Injektion von BIAsp30 spiegelt sich auch in den erhobenen primären pharmakodynamischen Endpunkt-Parametern wider, die in Tabelle 5 aufgeführt sind. Hier zeigte sich eine höhere Gesamtfläche unter den GIR-Profilen unter BIAsp30, die im Wesentlichen durch eine höhere Fläche in den ersten vier Stunden nach der dritten Injektion bedingt war. Diese Fläche ($AUC_{GIR0-4h}$) betrug nach der dritten Injektion von BIAsp30 im Mittel 625 mg/kg, während alle sonstigen $AUC_{GIR0-4h}$ -Werte sowohl für BIAsp30 als auch für die Basis-Bolus-therapie bei unter 500 mg/kg lagen. Ebenso war die maximale Glucose-infusionsrate GIR_{max} nach der dritten BIAsp30-Injektion deutlich höher (3.5 mg/kg/min) als GIR_{max} nach allen anderen Injektionen, wo die Werte stets unter 3 mg/kg/min lagen.

Abbildung 2: Profile der mittleren Glucoseinfusionsraten

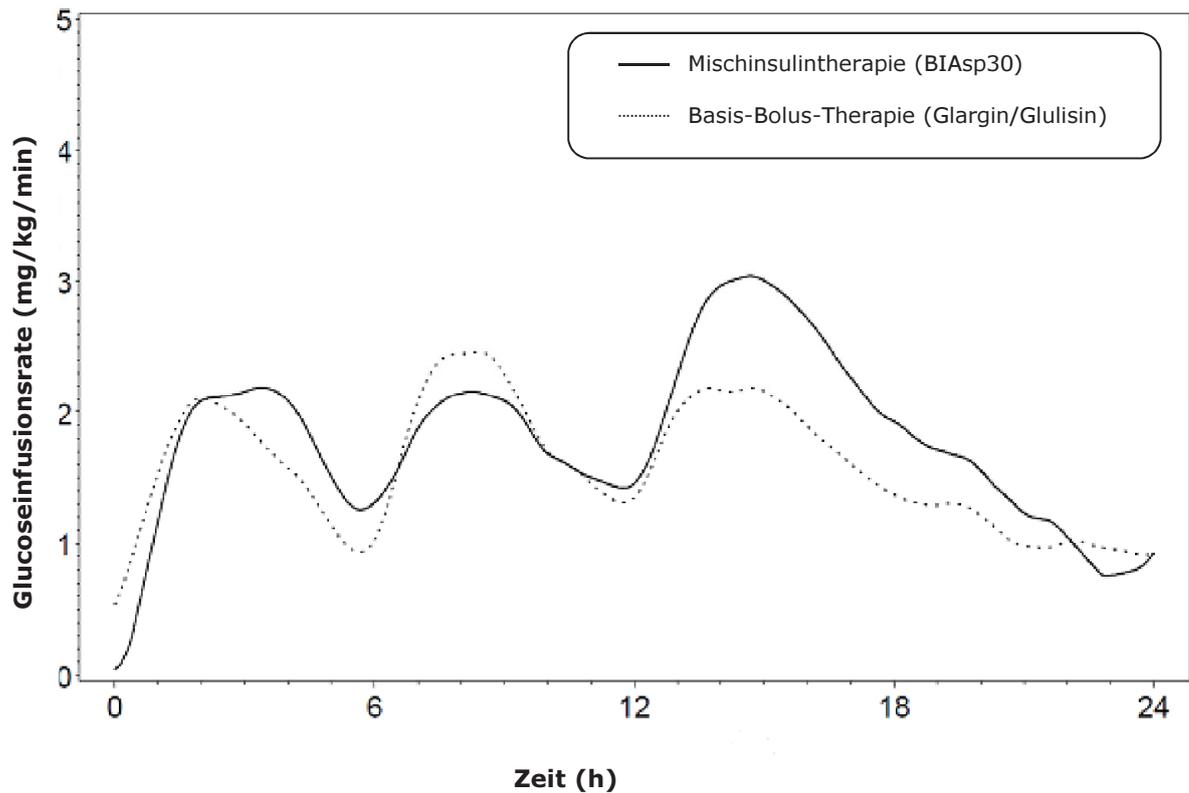


Tabelle 5: Primäre pharmakodynamische Endpunkte der Studie (Mittelwert (SD))

	BIAsp30 TID	Basis-Bolus Therapie (Glulisin/Glargin)
$AUC_{GIR\ 0-24h}$ (mg/kg)	2585 (1165)	2289 (1095)
Erste Injektion (Zeitpunkt 0h, ca. 7 Uhr)		
$AUC_{GIR\ 0-4h}$ (mg/kg)	393 (307)	402 (345)
GIR_{max} (mg/kg/min)	2,6 (1,7)	2,4 (1,9)
$tGIR_{max}$ (h)	3,1 (1,0)	2,6 (1,3)
Zweite Injektion (Zeitpunkt 6h, ca. 13 Uhr)		
$AUC_{GIR\ 0-4h}$ (mg/kg)	459 (245)	498 (265)
GIR_{max} (mg/kg/min)	2,5 (1,1)	2,8 (1,4)
$tGIR_{max}$ (h)	2,8 (1,2)	2,7 (1,1)
Dritte Injektion (Zeitpunkt 12h, ca. 19 Uhr)		
$AUC_{GIR\ 0-4h}$ (mg/kg)	625 (304)	481 (230)
GIR_{max} (mg/kg/min)	3,5 (1,6)	2,7 (1,2)
$tGIR_{max}$ (h)	3,7 (1,8)	3,4 (2,1)

Der Zeitpunkt der maximalen GIR (t_{GIRmax}) war nicht wesentlich unterschiedlich zwischen den beiden Insulintherapieformen. Generell trat jedoch t_{GIRmax} nach der dritten Injektion später auf als bei den vorigen Injektionen (Tabelle 5). Die Ergebnisse der primären pharmakodynamischen Endpunkte $\text{AUC}_{\text{GIR}0-4\text{h}}$, GIR_{max} und t_{GIRmax} sind noch einmal in den Abbildungen 2 bis 4 dargestellt.

Abbildung 3: $\text{AUC}_{\text{GIR}0-4\text{h}}$ nach den drei Injektionen von BIAsp bzw. Insulin Glulisin

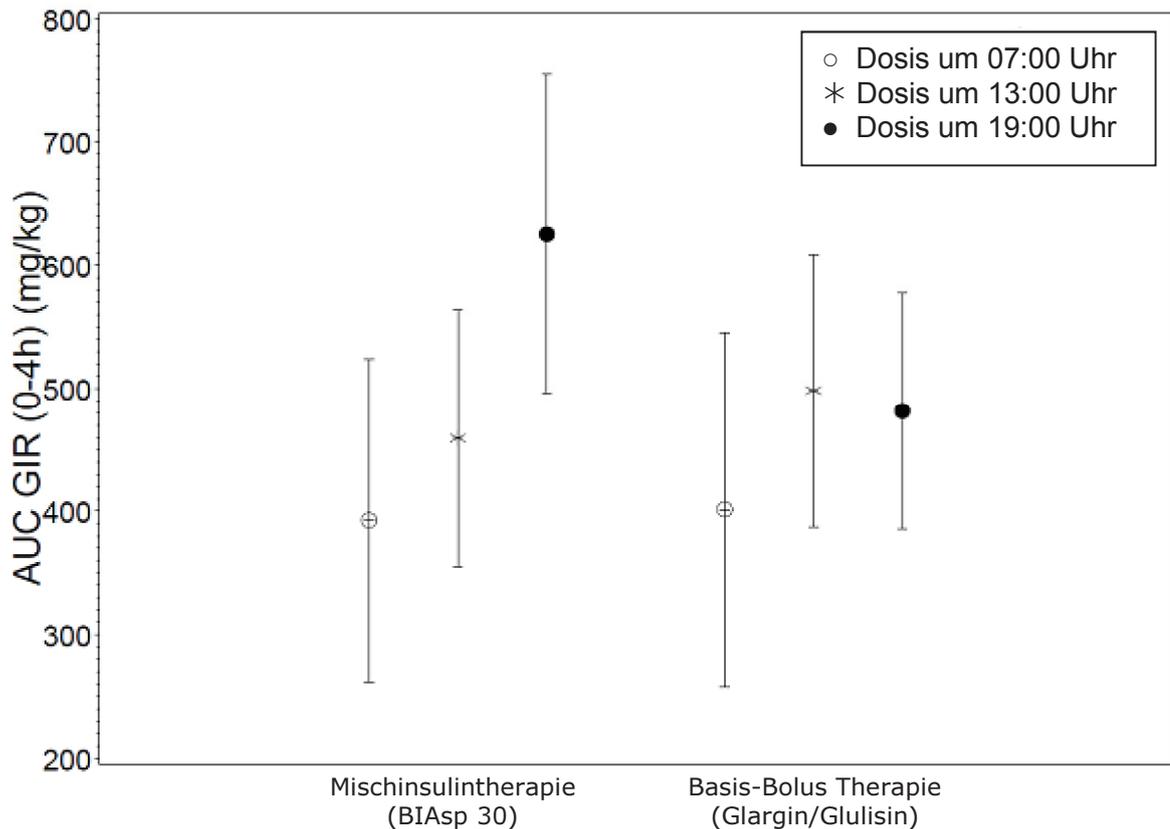
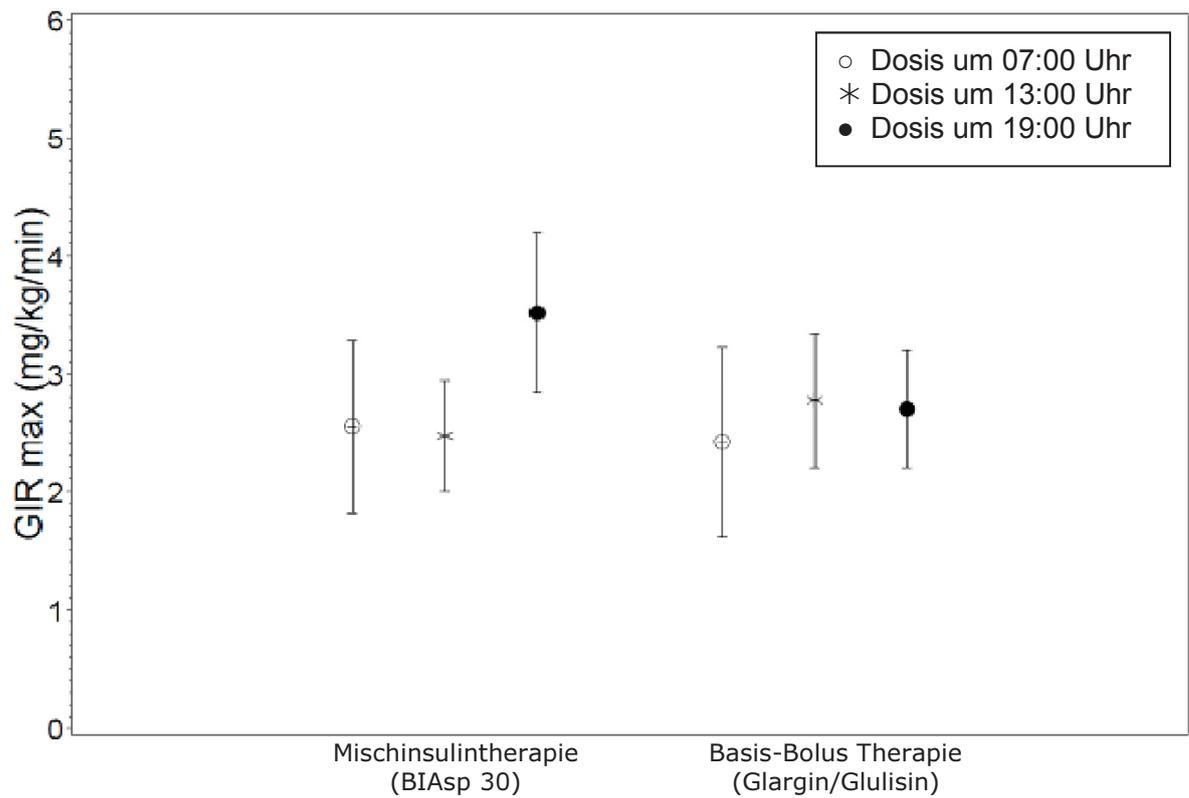
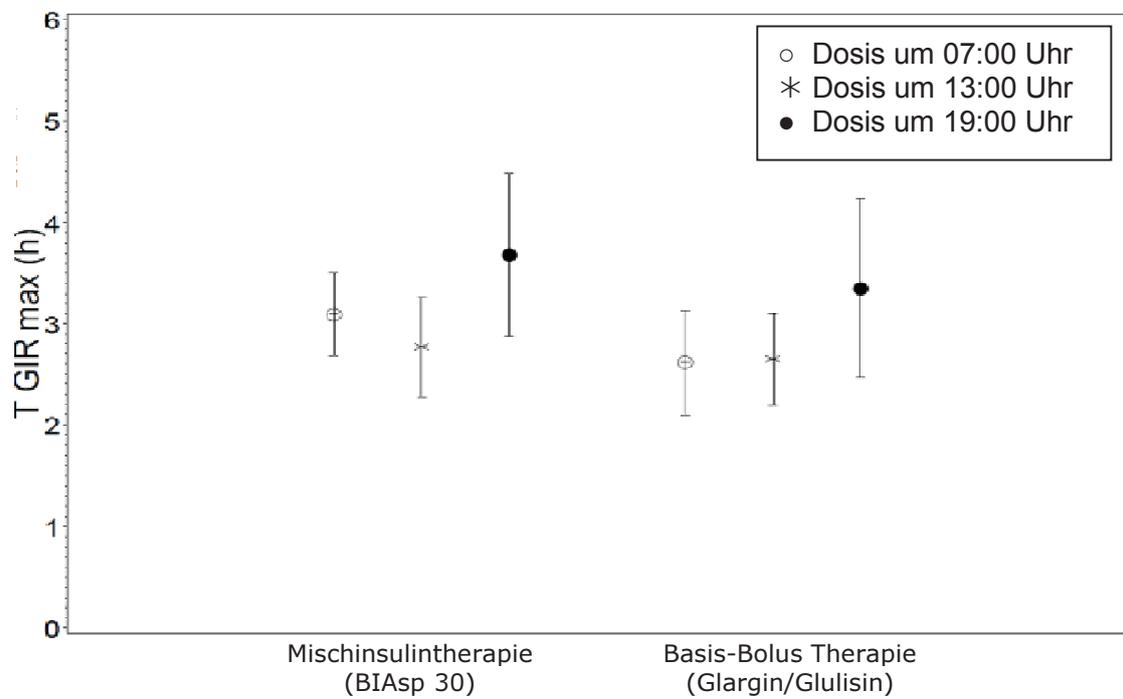


Abbildung 4: GIR_{max} nach den drei Injektionen von BIAsp bzw. Insulin GlulisinAbbildung 5: t_{GIRmax} nach den drei Injektionen von BIAsp bzw. Insulin Glulisin

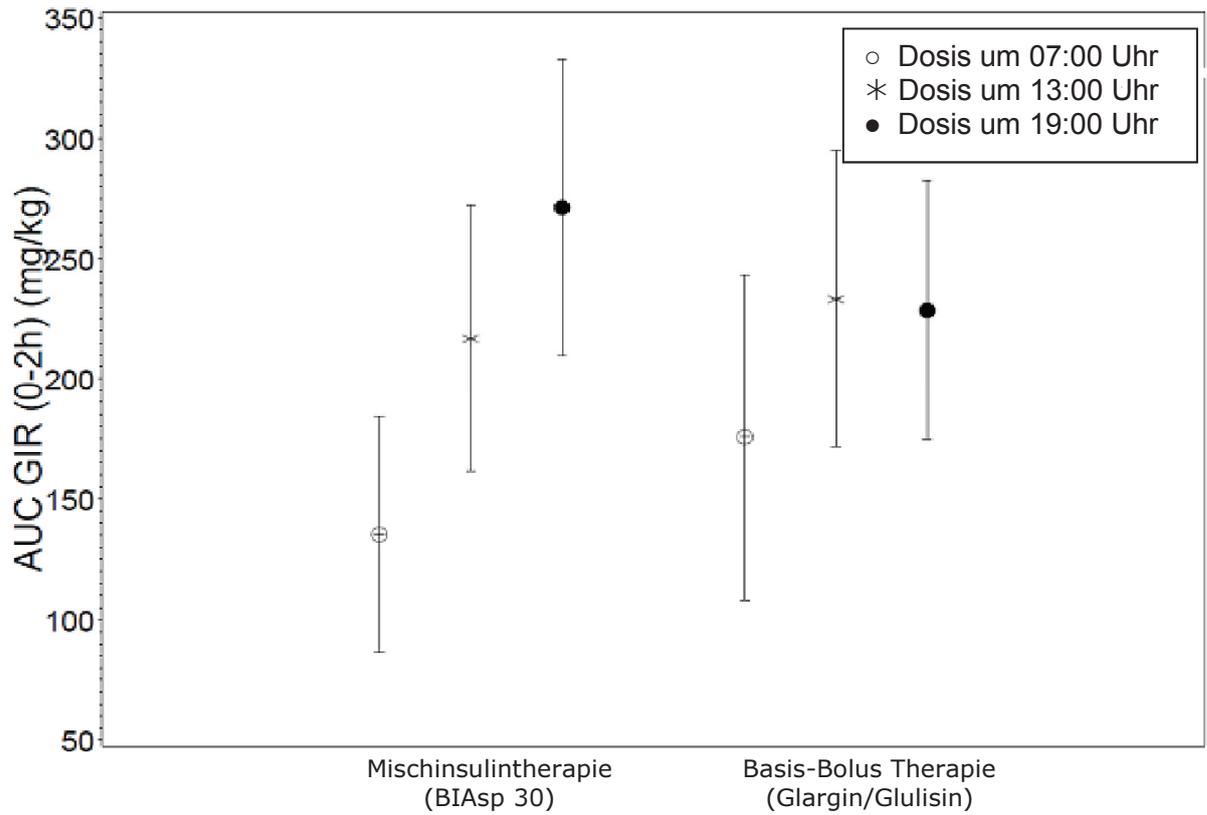
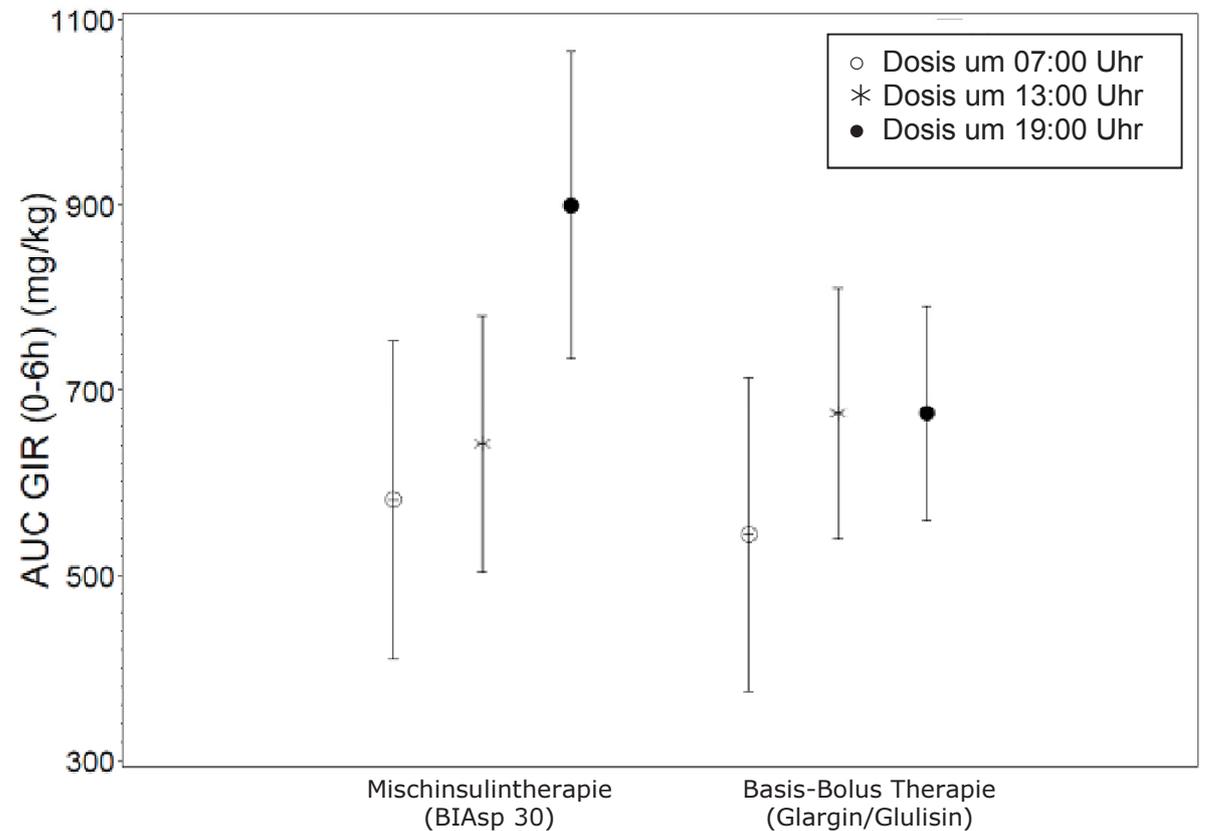
4.3.2 Sekundäre pharmakodynamische Endpunkte

Die sekundären pharmakodynamischen Endpunkte sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Sekundäre pharmakodynamische Endpunkte der Studie (Mittelwert (SD))

	BIAsp30 TID	Basis-Bolus Therapie (Glulisin/Glargin)
$AUC_{GIR\ 0-12h}$ (mg/kg)	1223 (665)	1219 (698)
$AUC_{GIR\ 12-24h}$ (mg/kg)	1362 (552)	1070 (462)
Erste Injektion (Zeitpunkt 0h, ca. 7 Uhr)		
$AUC_{GIR\ 0-2h}$ (mg/kg)	135 (115)	176 (162)
$AUC_{GIR\ 0-6h}$ (mg/kg)	582 (404)	544 (407)
Zweite Injektion (Zeitpunkt 6h, ca. 13 Uhr)		
$AUC_{GIR\ 0-2h}$ (mg/kg)	217 (130)	233 (148)
$AUC_{GIR\ 0-6h}$ (mg/kg)	646 (326)	675 (325)
Dritte Injektion (Zeitpunkt 12h, ca. 19 Uhr)		
$AUC_{GIR\ 0-2h}$ (mg/kg)	271 (145)	229 (130)
$AUC_{GIR\ 0-6h}$ (mg/kg)	890 (389)	675 (278)

Die Fläche unter den Glucose-infusionsraten in den ersten 2 Stunden ($AUC_{GIR0-2h}$) nach Injektion nimmt von der ersten bis zur dritten Injektion von BIAsp30 stetig zu, während sie nach Gabe von Insulin Glulisin (ausgehend von etwas höheren Werten als bei BIAsp30 nach der ersten Injektion) zwar von der ersten zur zweiten, jedoch nicht mehr nach der dritten Injektion ansteigt (Abbildung 5). Im Einklang mit den primären pharmakodynamischen Endpunkten sind die Flächen unter den GIR-Kurven in den ersten sechs Stunden ($AUC_{GIR0-6h}$) zwischen allen Injektionen vergleichbar, lediglich nach der dritten Injektion von BIAsp30 gegen 19 Uhr ist diese Fläche deutlich größer (890 mg/kg im Vergleich zu 544-675 mg/kg bei den übrigen Injektionen, Abbildung 6). Daraus resultiert dann auch eine größere Fläche in den zweiten zwölf Stunden des Wirkprofiles ($AUC_{GIR12-24h}$) für BIAsp30 im Vergleich zur Basis-Bolus-Therapie (1362 vs. 1070 mg/kg), während die entsprechende Fläche in den ersten zwölf Stunden fast identisch zwischen beiden Insulintherapieformen ist.

Abbildung 6: $AUC_{GIR0-2h}$ nach den drei Injektionen von BIAsp bzw. Insulin GlulisinAbbildung 7: $AUC_{GIR0-6h}$ nach den drei Injektionen von BIAsp bzw. Insulin Glulisin

4.4 Pharmakokinetik: Insulinkonzentrationen

Die pharmakokinetischen Ergebnisse sind in Abbildung 7 und Tabelle 7 dargestellt. Da mangels kommerzieller Verfügbarkeit eines geeigneten Assay keine Insulin Glulisin-Konzentrationen bestimmt werden konnten, ist ein direkter Bezug zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Endpunkten nicht möglich.

Insbesondere ist nicht zu klären, ob der höhere pharmakodynamische Effekt nach der dritten Injektion von BIAsp30 im Vergleich zur Basis-Bolus-Therapie sich auch in den Insulinkonzentrationen wieder findet. Immerhin finden sich jedoch höhere Plasma-Insulin Aspart-Konzentrationen (also höhere Werte für die maximale Konzentration als auch für die Flächen unter den Kurven) nach der dritten Injektion als nach den ersten beiden BIAsp30-Injektionen. Dies führt jedoch nicht zu Unterschieden in den Flächen unter den Insulin Aspart-Konzentrationen zwischen der ersten und der zweiten Hälfte der Experimente (vergleichbare Werte für $AUC_{INS0-12h}$ und $AUC_{INS12-24h}$). Die Zeitpunkte der maximalen Insulin Aspart-Konzentrationen (t_{INSmax}) sind bei allen drei BIAsp30-Injektionen vergleichbar.

Abbildung 8: Plasma-Konzentrationen von Insulin Aspart und Insulin Glargin über 24h

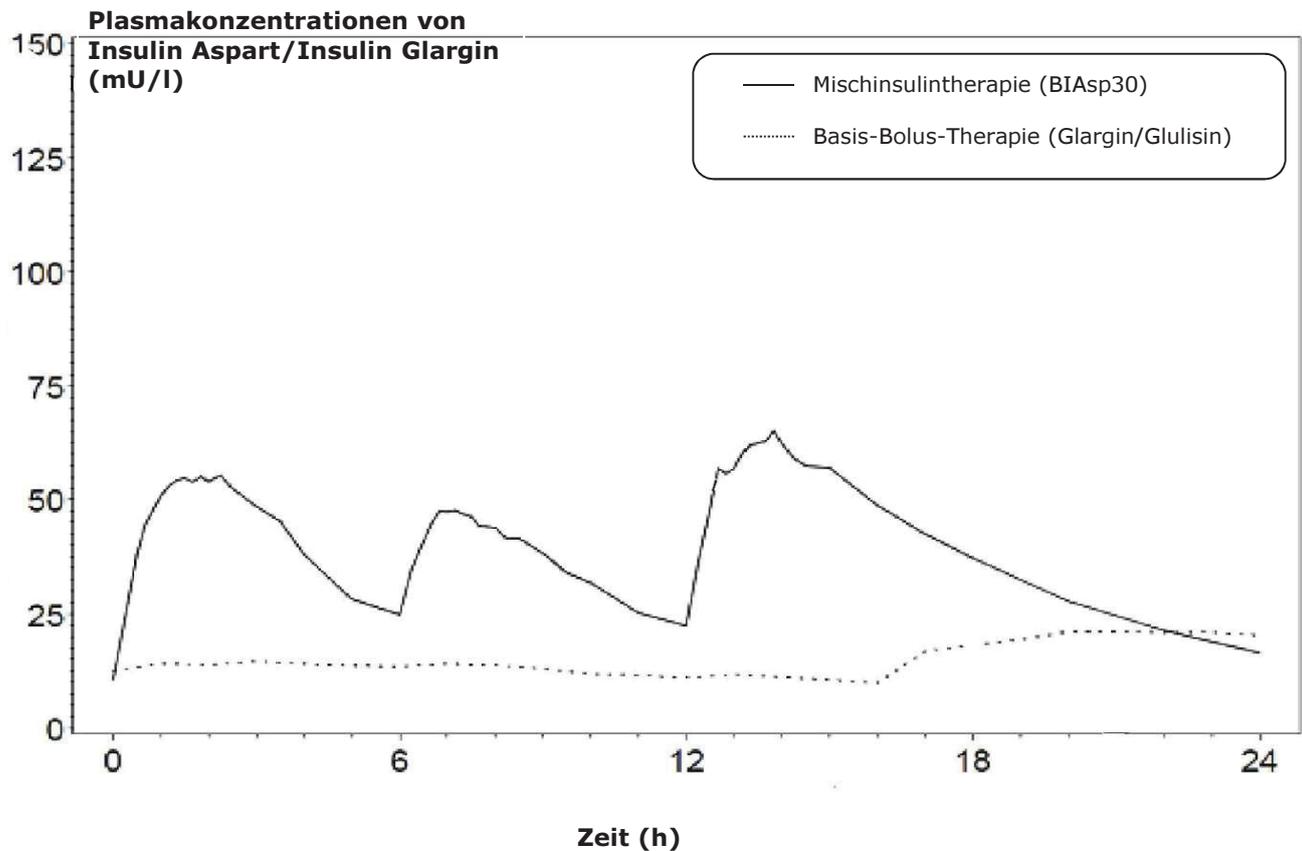


Tabelle 7: Endpunkte basierend auf den Insulin Aspart-Konzentrationen

	Mittelwert (SD)
$AUC_{INS\ 0-24h}$ (mU*h/l)	912 (367)
$AUC_{INS\ 0-12h}$ (mU*h/l)	454 (197)
$AUC_{INS12-24h}$ (mU*h/l)	458 (179)
Erste Injektion (Zeitpunkt 0h, ca. 7 Uhr)	
$AUC_{INS\ 0-2h}$ (mU*h/l)	84 (49)
$AUC_{INS\ 0-4h}$ (mU*h/l)	179 (93)
$AUC_{INS\ 0-6h}$ (mU*h/l)	239 (114)
C_{INSmax} (mU/l)	64 (34)
t_{INSmax} (h)	1,8 (0,6)
Zweite Injektion (Zeitpunkt 6h, ca. 13 Uhr)	
$AUC_{INS\ 0-2h}$ (mU*h/l)	86 (44)
$AUC_{INS\ 0-4h}$ (mU*h/l)	161 (72)
$AUC_{INS\ 0-6h}$ (mU*h/l)	214 (90)
C_{INSmax} (mU/l)	52 (27)
t_{INSmax} (h)	1,6 (0,7)
Dritte Injektion (Zeitpunkt 12h, ca. 19 Uhr)	
$AUC_{INS\ 0-2h}$ (mU*h/l)	106 (46)
$AUC_{INS\ 0-4h}$ (mU*h/l)	213 (89)
$AUC_{INS\ 0-6h}$ (mU*h/l)	298 (122)
C_{INSmax} (mU/l)	73 (33)
t_{INSmax} (h)	1,9 (0,7)

4.5 Sicherheitsrelevante Endpunkte

4.5.1 Exposition zur Studienmedikation

Dreiundzwanzig der eingeschlossenen 24 Patienten absolvierten beide im Protokoll vorgesehenen Experimente. Der Patient mit der Screening-Nummer 02 brach den ersten Versuch nach der ersten abendlichen Gabe von BIAsp30 aufgrund von drei schweren unerwünschten Ereignissen ab, bevor das eigentliche Clamp-Experiment begonnen hatte (siehe unten). Da die Dosis der Studienmedikation sich an der Tagesinsulindosis (in U/kg/Tag) der in die Studie eingeschlossenen Patienten orientierte, war diese Dosis zwischen den Patienten unterschiedlich, jedoch war die Gesamtdosis für jeden individuellen Patienten identisch. Die Gesamtdosis wurde wie folgt auf die einzelnen Injektionen aufgeteilt: Bei Gabe von BIAsp30 wurde 40% der Tagesinsulindosis um 19 Uhr am Abend vor dem Clamp verabreicht. Während des Clamps wurden jeweils 40% der Tagesinsulindosis um 7 und 19 Uhr injiziert und 20% um 13 Uhr. Bei der Basis-Bolus-Therapie wurde Insulin Glargin in einer Dosis von jeweils 60% der Tagesinsulindosis um 23 Uhr vor dem Clampversuch und auch während des Clampversuchs gegeben. Insulin Glulisin wurde in einer Dosis von jeweils 13,3% der Tagesinsulindosis um 7, 13 und 19 Uhr während des Glucose-Clampversuchs gegeben.

Die genau verabreichten Dosierungen der Studienmedikation sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet:

Tabelle 8: Insulin-Dosierungen während der Studie in U/kg (Mittelwert (SD))

	BIAsp30 TID	Basis-Bolus Therapie (Glulisin/Glargin)
Injektion am Vorabend des Clamps	0,29 (0,10)	0,44 (0,10)
Erste Injektion während des Clamps (7 Uhr)	0,30 (0,10)	0,1 (0,02)
Zweite Injektion während des Clamps (13 Uhr)	0,15 (0,02)	0,1 (0,02)
Dritte Injektion während des Clamps (19 Uhr)	0,30 (0,10)	0,1 (0,02)
Vierte Injektion während des Clamps (23 Uhr)	-	0,44 (0,10)

4.5.2 Unerwünschte Ereignisse (Adverse Events)

Insgesamt traten während der Studie 17 Adverse Events bei vierzehn Patienten auf, darunter drei schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (Serious Adverse Events) bei dem Patienten mit der Screening-Nummer 02, der die Studie aufgrund dieser Ereignisse nicht beendete. Ein Überblick über die aufgetretenen Adverse Events gibt Tabelle 9.

Tabelle 9: Adverse Events während der Studie (Anzahl Patienten (Ereignisse))

	BIAsp30 T1D	Basis-Bolus Therapie (Glulisin/Glargin)
Adverse Events insgesamt	8 (11)	6 (6)
Ernsthafte (Severe) Adverse Events	1 (3)	0 (0)
Mittelschwere (Moderate) Adverse Events	5 (6)	3 (3)
Leichte (Mild) Adverse Events	2 (2)	3 (3)

Das am häufigsten beobachtete Adverse Event waren Kopfschmerzen, die insgesamt 7 Mal bei 5 Patienten auftraten. Unter den Adverse Events befand sich auch ein Ereignis einer leichten Hypoglykämie, die bei einer Patientin vor Gabe der ersten Studienmedikation am Vorabend des Glucose-Clampversuchs auftrat. Die Patientin war in der Lage, die Hypoglykämie selbst zu behandeln, so dass der Clampversuch wie vorgesehen stattfinden konnte.

Die drei Serious Adverse Events traten alle bei dem Patienten mit der Screening-Nr 02 auf. Der Patient hatte zunächst bei der ersten Dosierungsvisite (Visite 2) am Vorabend des Clamps die vorgesehene Injektion von BIAsp30 erhalten. Der Clampversuch konnte jedoch nicht durchgeführt werden, weil das Legen der erforderlichen venösen Zugänge aufgrund schwieriger Venenverhältnisse nicht gelang. Der Versuch wurde daraufhin auf einen Termin 12 Tage nach dem ersten Versuch verschoben. Am Vorabend des neuen Termins entwickelte der Patient Fieber und wurde später stationär mit den Diagnosen Pyrexie, Gastroenteritis und Pneumonie aufgenommen. Ein Zusammenhang der drei Serious Adverse Events mit der Gabe der Studienmedikation wurde als unwahrscheinlich eingestuft. Bei Studienende waren alle Adverse Events, inklusive der drei Serious Adverse Events, abgeschlossen.

4.5.3 Sicherheitslaborparameter

Bei der ersten und bei der vierten Visite (also bei den Visiten vor und nach den Dosierungsvisiten) wurden die folgenden Laborparameter bestimmt: Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium (gesamt), anorganisches Phosphat, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Glucose, Gesamt-Eiweiß, Albumin, Bilirubin (gesamt), Creatinkinase (CK), alkalische Phosphatase (AP), γ -Glutamyltransferase (γ -GT), Aspartat Aminotransferase (AST, SGOT), Alanin Aminotransferase (ALT, SGPT), Cholesterin(gesamt), Triglyceride, Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), Mittlere korpuskuläre Hämoglobin Konzentration (MCHC), Leukozyten, Differential-Blutbild und Thrombozyten. Darüber hinaus wurde ein Urinstatus (Eiweiß, Glucose, Erythrozyten, Leukozyten, pH, Nitrit, Ketonkörper, Bilirubin, Urobilinogen, spezifisches Gewicht) erhoben. Gerinnungsparameter (Prothrombinzeit, gemessen als international

normalised ratio (INR) und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)) wurden nur bei Visite 1 gemessen. Bei keinem der erhobenen Sicherheitslaborparameter zeigten sich klinisch relevante Abweichungen vom Normbereich oder klinisch relevante Veränderungen zwischen Studienbeginn und Studienende.

4.5.4 Vitalwerte

Vitalwerte (systolischer und diastolischer Blutdruck, Pulsfrequenz und im Ohr gemessene Körpertemperatur) wurden bei allen Visiten erhoben. Klinisch relevante Abweichungen von der Norm traten nicht auf.

4.5.5 Körperlicher Untersuchungsbefund

Körperliche Untersuchungen wurden bei Visite 1 und Visite 4 durchgeführt. Bei 18 der 24 Patienten wurden Abweichungen von der Norm festgestellt, die jedoch nicht für klinisch relevant erachtet wurden. Die häufigste dieser Abweichungen war ein vermindertes Vibrationsempfinden, das mittels Stimmgabeltest untersucht und bei 15 Patienten festgestellt wurde. Das Körpergewicht wurde bei allen Visiten ermittelt. Größere Abweichungen vom Ausgangsgewicht traten nicht auf (das mittlere Körpergewicht betrug 100,0 kg bei Visite 1 und 95,5 kg bei Visite 4).

4.5.6 EKG

Ein 12-Kanal EKG wurden bei Visite 1 und bei Visite 4 bei allen Patienten durchgeführt. Bei 8 der 24 Patienten wurden leichte EKG-Anomalitäten bei der Screening-Visite (Visite 1) festgestellt, die jedoch alle als klinisch nicht relevant angesehen wurden. Abweichungen zwischen den EKGs an Visite 1 und Visite 4 traten bei keinem der Patienten auf.

4.5.7 Sonstige Sicherheitsparameter

Zusätzlich zu dem genannten Sicherheitsparameter wurde bei allen Patienten ein Alkoholatemtest bei allen Visiten und bei den 3 weiblichen Patienten ein Schwangerschaftstest an den Visiten 2, 3 und 4 durchgeführt. Sämtliche dieser Tests waren negativ.

4.6 Qualität der Glucose-Clampversuche

Um die Qualität der Glucose-Clampversuche zu beurteilen, wurde die mittlere Blutglucosekonzentration während der Versuche sowie die Fluktuation um den Mittelwert berechnet. Letztere wurde zum einen als Variationskoeffizient der mittleren Blutglucose-Konzentration ausgedrückt, zum anderen als "root-mean square" der Blutglucose-Abweichungen vom Zielwert. Dafür wird die Summe aus den quadrierten Ab-

weichungen jedes Blutglucosewertes (BG) vom Zielwert (BG_{Ziel}) gebildet, durch die Anzahl der Messungen minus 1 geteilt und daraus die Wurzel gezogen:

$$\text{Root mean square} = \sqrt{\frac{\sum(BG - BG_{Ziel})^2}{n - 1}}$$

Die mittleren Blutglucosewerte lagen sehr nahe am Zielwert von 90 mg/dl: Bei den Versuchen mit der Mischinsulintherapie betragen die mittleren Blutglucosewerte 90,6 mg/dl (Bereich 89,8-92,2 mg/dl), bei der intensivierten Insulintherapie lag die mittlere Blutglucose bei 90,5 (89,6-92,4) mg/dl. Die Variationskoeffizienten lagen bei $5,7 \pm 2,2\%$ (Mischinsulintherapie) bzw. $5,8 \pm 1,8\%$ (intensivierte Insulintherapie). Auch die Mittelwerte für das "root mean square" waren zwischen beiden Behandlungsarmen vergleichbar ($8,4 \pm 3,9$ versus $10,2 \pm 5,8$ mg/dl).

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Charakterisierung der Wirkprofile zweier gebräuchlicher Insulintherapie-Strategien (Mischinsulin dreimal täglich und intensivierete Insulintherapie) über 24 Stunden. Im Vordergrund stand dabei nicht ein statistischer Vergleich zwischen den beiden Strategien, sondern vielmehr eine Visualisierung der Insulinwirkung, wie sie durch die Kombination der verwendeten Insuline hervorgerufen wird. Das wesentliche Ergebnis dieser Untersuchung ist somit in Abbildung 1 dieser Arbeit wiedergegeben. Insgesamt zeigen sich zunächst keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Strategien, die Wirkung ist in den ersten zwölf Stunden (also bis ca. 19 Uhr, dem Zeitpunkt der dritten Insulininjektion während des Clampversuches) vergleichbar. Danach steigt die Wirkung jedoch bei der Mischinsulin-Therapie mit BIAsp30 stärker an und führt zu einem höheren Wirkmaximum als nach der dritten Gabe von Insulin Glulisin bei der intensivierten Insulintherapie. Erst nach ca. 22 Stunden treffen sich die Wirkprofile beider Strategien wieder.

Die verwendeten Insulinstrategien sind gebräuchliche Strategien bei Patienten mit Typ 2 Diabetes und werden häufig zur Intensivierung einer Therapie eingesetzt. Die Erst-einleitung einer Insulintherapie erfolgt zumeist mit der Einmalgabe eines Basalinsulins wie Insulin Glargin in Kombination mit oralen Antidiabetika oder mit der Gabe eines Mischinsulins einmal oder zweimal täglich [64]. Wenn diese Therapieansätze nicht zum Erreichen der gewünschten Blutglucose-konzentrationen führen, wird (zum Teil allmählich durch die schrittweise Addition jeweils einer weiteren Insulininjektion) auf eine intensivierete Insulintherapie oder auf die dreimal tägliche Gabe eines Mischinsulins umgestellt. Letzteres erfolgt häufig bei älteren Patienten, die Schwierigkeiten mit den bei der intensivierten Insulintherapie notwendigen häufigen Blutglucose-Selbstmessungen und der Anpassung der Insulindosierungen an die gemessenen Glucosewerte und die beabsichtigte Kohlenhydrat-Zufuhr haben. Insbesondere für diese Patienten mit dreimal täglicher Injektion eines Mischinsulins wird von einigen Experten die Verwendung von Mischinsulinen mit kürzer wirkenden Insulin-Analoga (wie z.B. Novomix) empfohlen, um die durch die relativ lange Wirkdauer von Altinsulin mögliche Überlappung der Insulinwirkung zu vermeiden [18]. Alternativ wäre auch die Verwendung von Mischinsulinen mit einem geringeren Anteil an protaminiertem Insulin möglich [65], jedoch werden diese Mischinsuline im Alltag nur bei wenigen Patienten verwendet [66].

Es ist beachtlich, dass, obwohl viele Glucose-Clamp-Untersuchungen zur Charakterisierung des Wirkprofils einzelner Insulinformulierungen bei Einmalgabe vorliegen, nur sehr wenige Studien die Wirkung einer Kombination mehrerer Insulinformulierungen, wie sie in gebräuchlichen Insulintherapie-Strategien angewendet werden, untersucht hat. Trotzdem werden in vielen Ratgebern für die Durchführung einer Insulintherapie (häufig idealisierte) Gesamt-Wirkprofile bei verschiedenen Insulinstrategien abgebil-

det, die aber kaum auf realen Daten beruhen können. Von daher liefert die vorliegende Untersuchungen interessante Informationen, die Ärzten und Patienten wichtige Hinweise für die Durchführung einer Insulintherapie geben können. So ist es beispielsweise interessant, dass selbst bei einer intensivierten Insulintherapie mit der Gabe eines kurzwirkenden Insulinanalogons die Wirkung des morgens und mittags gegebenen Insulins trotz einer relativ kleinen Dosis (0,1 U/kg) länger als 6 Stunden anhält, so dass bei Gabe des Insulins mittags und abends noch eine deutlich höhere Restwirkung der zuvor gegebenen Insuline vorhanden ist als morgens. Da Protaminverzögertes Insulin eine deutlich längere Wirkdauer als schnellwirksame Insuline und einen Wirkgipfel nach ca. 8-10 Stunden aufweisen, ist bei der Mischinsulin-Therapie die Überlagerung der Wirkung der einzelnen Insulininjektionen noch ausgeprägter als bei der intensivierten Insulintherapie. Dies führt dann nach der dritten Insulininjektion (zwölf Stunden nach Beginn des Glucose-Clamps) zu einer stärkeren Insulinwirkung und einem höheren Wirkmaximum als bei der intensivierten Insulintherapie.

Selbstverständlich wäre es möglich, das höhere Wirkmaximum nach der dritten Insulininjektion durch Verwendung einer niedrigeren Insulindosis zu vermeiden. Auch wenn bisher für Mischinsulin keine Dosis-Wirkungs-Studien publiziert wurden, zeigen Glucose-Clamp-Studien sowohl für kurzwirkende Insuline (Altinsulin und Insulin-Analoga) als auch für basale Insulin-Analoga eine lineare Steigerung des Wirkmaximums, der Gesamtwirkung (gemessen als Fläche unter den Glucose-infusionsraten) und interessanterweise auch eine Zunahme der Wirkdauer [45;48;67;68]. Somit sollte es möglich sein, durch eine geeignete Reduktion der Dosis des Mischinsulins bei der dritten Injektion ein gleiches Wirkmaximum wie bei der intensivierten Insulintherapie zu erzielen. Allerdings erscheint es fraglich, ob die Wirkprofile beider Therapieformen durch diese Dosisreduktion wirklich nahezu deckungsgleich wären. Eine geringere Dosis des Mischinsulins würde auch zu einer Verkürzung der Wirkdauer nicht nur des kurzwirksamen, sondern auch des länger wirksamen protaminierten Anteils führen. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass die Wirkprofile beider Therapieformen nach 24 Stunden wieder ein gleiches Level erreichen wie dies mit den in dieser Untersuchung gewählten Dosierungen der Fall ist.

Um eine wirkliche Deckungsgleichheit beider Wirkprofile zu erreichen, müsste vermutlich als zweite Injektion bei der Mischinsulin-Therapie ein kurzwirksames Insulin (Altinsulin oder Insulinanalogon) verwendet werden. Damit entfielen der durch das protaminierte Insulin Aspart verursachte Anstieg der Wirkung nach ca. 6 Stunden, der sich zu der Wirkung der dritten Mischinsulin-Injektion addiert. Tatsächlich wird von einigen Autoren die Verwendung von Altinsulin oder zumindest von Mischinsulinen mit einem hohen nicht protaminierten Insulinanteil mittags empfohlen [65].

Die Aufteilung der Tagesdosis in diesem Versuch resultiert aus früheren Studien mit diesen oder vergleichbaren Insulinen. Die Aufteilung der BIAsp30-Dosis über den Tag (40-20-40%) wurde aus der sogenannten 1-2-3 Studie abgeleitet [18], bei der Patien-

ten bei dreimal täglicher Injektion von BIAsp30 38% der Insulintagesdosis zum Frühstück, 16% zum Mittagessen und 46% zum Abendessen injizierten. Da keine publizierten Studien vorliegen, bei denen Insulin Glargin und Insulin Glulisin in einer intensivierten Insulintherapie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes angewendet wurde, wurde für die Aufteilung der Tagesdosis zwischen Basal- und kurzwirkendem Insulin die Studie von Raslova et al. [59] herangezogen. In dieser Studie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes bestand ein Behandlungsarm aus einer intensivierten Insulintherapie mit Insulin Detemir und Insulin Aspart. Am Ende der Studie betrug die mittlere Insulintagesdosis 0,58 U/kg Insulin Detemir und 0,37 U/kg Insulin Aspart, was ziemlich genau der Aufteilung von 60% Basalinsulin und 40% schnellwirkendem Insulin entspricht, die in dieser Studie angewendet wurde. Die Tagesdosis des schnellwirkenden Insulins wurde dann gleichmäßig auf die 3 Dosierungen während der Studie aufgeteilt.

Im klinischen Alltag sollte die Entscheidung für eine bestimmte Form der Insulintherapie immer individuell anhand der Fähigkeiten und Bedürfnisse des jeweiligen Patienten getroffen werden [64]. Diese Empfehlung wird durch die Betrachtung der individuellen Wirkprofile (siehe Anhang dieser Arbeit) unterstrichen. Dort finden sich deutliche Unterschiede in den Wirkprofilen einer Therapieform zwischen verschiedenen Patienten. Zudem sind auch bei einzelnen Patienten erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Therapieformen nachweisbar, während die mittleren Glucoseinfusionsraten-Profile (siehe Abbildung 1) zumindest in den ersten 12 Stunden des Versuchs sehr ähnlich sind. Eine Ursache für die Abweichungen zwischen individuellen und mittleren Profilen sind Unterschiede in der individuellen Insulinsensitivität nicht nur bei verschiedenen Patienten[69], sondern auch zwischen den zwei Versuchstagen eines Individuums. Es ist bekannt, dass die intra-individuelle Insulinsensitivität von vielen, leicht veränderlichen Faktoren abhängt, wie z.B. Blutzuckereinstellung (insbesondere Blutzuckervariabilität und das Auftreten hypoglykämischer Ereignisse) [70], körperlicher Aktivität [71], Ernährung [72;73] oder Vitamin D Status [74]. Somit ist es nicht erstaunlich, dass die Insulinsensitivität von verschiedenen Patienten unterschiedlich ist, aber auch innerhalb eines Patienten von Versuchstag zu Versuchstag variiert.

Eine weitere mögliche Ursache für die Abweichungen von individuellen und mittleren Ergebnissen liegt in der Variabilität der Insulinwirkung. Zwar gibt es keine Untersuchungen zur Variabilität von Mischinsulinen, jedoch wurde in pharmakologischen Studien eine beträchtliche Variabilität sowohl von Insulin Aspart als auch von Basalinsulinen (Insulin Glargin und NPH-Insulin) festgestellt. Die intra-individuelle Variabilität (berechnet als der Variationskoeffizient vom Mittelwert) der pharmakodynamischen Wirkparameter lag bei Insulin Aspart um die 20% [75]. Für die Basalinsuline war die Variabilität deutlich ausgeprägter: Der Variationskoeffizient lag bei Insulin Glargin je nach Studie und Parameter bei 30-65% und bei NPH-Insulin bei 25-77% [23;43;76]. Die inter-individuelle Variabilität lag in einer ähnlichen Größen-

ordnung, spielt aber im klinischen Alltag nur eine untergeordnete Rolle, da Insulin individuell nach Wirkung titriert wird [24]. Die publizierten Daten für die Variabilität der Insulinwirkung erklären jedoch, zumindest zum Teil, die deutlich unterschiedlichen Wirkprofile zwischen verschiedenen und innerhalb einzelner Patienten.

Idealerweise hätten die Patienten jeden Therapiearm zweimal in gleicher Weise durchlaufen, um die intra-individuelle Variabilität zu erfassen. Eine Visualisierung der Schwankungen der individuellen Wirkprofile von Tag zu Tag wäre sicherlich von hoher klinischer Relevanz gewesen. Dies ließ sich jedoch schon allein aufgrund des Blutverlustes nicht realisieren (insgesamt haben die Studienteilnehmer bei dieser Studie durch die verschiedenen Studienmaßnahmen 380 ml Blut verloren, eine Ergänzung von zwei weiteren Versuchstagen hätte zu einem Blutverlust von >500 ml geführt).

Eine weitere Einschränkung der vorliegenden Untersuchung ist zudem der Mangel an pharmakokinetischen Analysen. In der Studienvorbereitung wurde versucht, eine Möglichkeit zur spezifischen Messung von Insulin Glulisin-Konzentration im Blut zu etablieren. Letztlich gelang es jedoch nicht, Zugang zu einem spezifischen Assay zu bekommen. In den Studien von Sanofi-Aventis (dem Hersteller von Insulin Glulisin) wurden Insulin Glulisin-Konzentration mittels eines spezifischen (kompetitiv bindenden) Radioimmunoassays bestimmt [39], der jedoch nicht kommerziell verfügbar ist. Der in den Studien von Sanofi-Aventis verwendete Assay führt anscheinend jedoch ohnehin nicht immer zu verlässlichen Ergebnissen. Zumindest lagen in mehreren Studien die gemessenen Insulin Glulisin-Studien trotz gleicher Dosis und vergleichbarer pharmakodynamischer Ergebnisse erheblich über den gemessenen Konzentrationen der Vergleichsinsuline (Insulin Aspart.), so dass auf eine Insulin Lispro Auswertung von konzentrationsbezogenen pharmakokinetischen Parametern verzichtet wurde oder eine Angleichung (Umrechnung der pharmakokinetischen Parameter bezogen auf die Maximalkonzentrationen) vorgenommen werden musste [39;40;77]. Auch wenn prinzipiell eine Verifizierung der pharmakodynamischen Ergebnisse durch die Pharmakokinetik wünschenswert ist, erscheint es aufgrund der Limitationen der verfügbaren Assay somit insgesamt fraglich, ob bei einer Studie wie der hier vorliegenden, bei der verschiedene Insulinanaloga verwendet wurde, die Bestimmung der Pharmakokinetik eine große Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse darstellt [78].

Als weitere Einschränkung mag die Durchführung der Studien bei Patienten mit Typ 2 Diabetes angesehen werden, bei denen neben der Erfassung der exogenen Insulinwirkung auch eine noch vorhandene endogene Insulinsekretion zu den gemessenen Wirkprofilen beitragen könnte. Tatsächlich wird übereinstimmend von mehreren Experten die Messung der Insulinwirkung mittels der Glucose-Clamp-Technik bei gesunden Probanden aufgrund der endogenen Insulinsekretion als Störgröße als nicht adäquat angesehen [24;79]. Die Messung von Wirkprofilen bei Patienten mit Typ 2 Diabetes wird dagegen als valide betrachtet, da die endogene Insulinsekretion nicht nur unter Clamp-, sondern auch unter Alltagsbedingungen relevant ist und zu einer Gesamt-

Insulinwirkung beitragen wird. Ausgeschlossen werden muss allerdings, dass es durch die im Rahmen des Glucose-Clampversuches verabreichten Glucoseinfusionsraten zu einer "künstlichen" Stimulation der endogenen Insulinsekretion kommt. Dies erfolgte in dieser Studie durch die Betrachtung der individuellen C-Peptid-Profile im Rahmen des (vor Entblindung durchgeführten) Datenreview-Meetings. Bei einem deutlichen Anstieg der C-Peptidkonzentrationen während eines Versuches wären die Ergebnisse dieses Versuches (zumindest teilweise) von der Auswertung ausgeschlossen worden. Ein nennenswerter Anstieg der C-Peptidkonzentrationen trat jedoch bei keinem der Versuche auf.

Somit kann es auch als einer der Stärken dieser Studie angesehen werden, dass die Durchführung in der relevanten Zielgruppe (insulinbehandelte Patienten mit Typ 2 Diabetes) erfolgte und damit in dieser Hinsicht dem klinischen Alltag entsprach. Einschränkung muss allerdings gesagt werden, dass die Bedingungen eines Glucose-Clampversuchs, bei dem die Patienten über lange Zeit keine Nahrung zu sich nehmen und bettlägerig sind, sicherlich keineswegs klinische Behandlungsrealität widerspiegelt. Trotzdem gilt die Glucose-Clamptechnik als der „gold standard“ für die Untersuchung von pharmakodynamischen Profilen, der auch von der europäischen Zulassungsbehörde gefordert wird [80]. Durch die hohe Standardisierung erlaubt die Glucose-Clamptechnik (im Gegensatz zu Alternativverfahren wie z.B. der Messung von Blutzuckerprofilen nach Testmahlzeiten) eine Messung der Insulinwirkung unabhängig von Störgrößen wie hormonaler Gegenregulation bei Hypoglykämien oder variabler oraler Glucoseabsorption [24;50;60]. Somit können auch bei relativ kleinen Patientenzahlen (in dieser Studie 24 Patienten mit Typ 2 Diabetes) zuverlässig pharmakodynamische Parameter erhoben werden. Voraussetzung ist allerdings eine gute Qualität der Glucose-Clampversuche mit nur geringen Abweichungen vom Blutglucose-Zielwert. Dies war in dieser Studie der Fall: Die mittleren Blutglucosewerte lagen mit 90,5 mg/dl (intensivierte Insulintherapie) bzw. 90,6 mg/dl (Mischinsulintherapie) sehr nahe am Zielwert von 90 mg/dl und auch die Fluktuationen um den Mittelwert (berechnet als Variationskoeffizient und "root mean square" der Abweichungen vom Zielwert) lagen bei beiden Behandlungsarmen in einem akzeptablen Bereich.

Neben der Verwendung der Glucose-Clamptechnik besteht eine Stärke der hier durchgeführten Versuche in der Etablierung von "Steady-State-Bedingungen" vor der Erhebung der Wirkprofile. Dies wurde durch die Injektion von Insulin Glargin bzw. von BIAsp30 am Vorabend erreicht. Dies führte zu einer leicht erhöhten Glucoseinfusionsrate bereits zum Zeitpunkt 0 bei der intensivierten Insulintherapie, nicht aber bei der Mischinsulintherapie. Dies entspricht der klinischen Erfahrung, dass protaminierte Insuline häufig eine zu kurze Wirkdauer haben, um den nächtlichen Insulinbedarf vollständig zu decken [81]. Die Wirkdauer von Insulin Glargin ist deutlich länger als die von protaminiertem Insulin [41;42], so dass hier bei abendlicher Injektion eine anhaltende Wirkung bis zum nächsten Morgen (und darüber hinaus) zu erwarten ist. Es fällt

jedoch auf, dass bei beiden Behandlungsarmen die Glucoseinfusionsraten bei Versuchsende (also 24 Stunden nach der ersten Insulininjektion) ein wenig höher liegen als zu Versuchsbeginn. Dies spricht dagegen, dass durch die eine Insulininjektion am Vorabend bereits Steady-State-Bedingungen vollständig etabliert werden konnten (unter Steady-State-Bedingungen müssten die Talspiegel (in diesem Fall die Glucoseinfusionsraten zum Zeitpunkt 0 und 24h) identisch sein [56]). Möglicherweise sind die leicht höheren Glucoseinfusionsraten aber auch durch andere Störgrößen mitverursacht: So könnte es z.B. durch Veränderung der Insulinsensitivität durch das prolongierte Fasten bei längeren Glucose-Clampversuchen zu einem Anstieg der Glucoseinfusionsraten über die Zeit kommen, zumindest bei Probanden beziehungsweise Patienten mit erhaltener endogener Insulinsekretion [79;82].

Trotz dieser Einschränkungen liefert die vorliegende Studie relevante Informationen für die Insulintherapie von Patienten mit Typ 2 Diabetes. Bisher waren pharmakodynamische Untersuchungen weitgehend auf den Vergleich von ähnlichen Insulinen (kurzwirksame, basale oder Mischinsuline) beschränkt [23;31;32;36;39;41;42;45;46;51;75;77;83-87]. Nur selten wurden unterschiedliche Insulinformen miteinander verglichen [88;89] und dann auch nur als Einmaldosierung von einzelnen Insulinen. Die Messung eines Wirkprofils von mehreren Insulinformen und –applikationen über einen Behandlungstag hinweg ist bis dato noch nicht durchgeführt worden. Im klinischen Alltag werden jedoch häufig mehrere Insulinpräparate gleichzeitig verwendet oder zumindest ein Insulinpräparat mehrfach täglich appliziert. Gerade bei Patienten mit unzureichender Blutzuckereinstellung oder mit häufigen Hypoglykämien ist es von Bedeutung, die Überlappung der Insulinwirkungen mit Wirkspitzen und –tälern zu kennen, um durch Dosisanpassungen oder, falls erforderlich, auch weitergehende Umstellungen der Insulintherapie eine Optimierung der Blutzuckereinstellung zu erreichen.

In der vorliegenden Studie sollten daher die Wirkprofile von zwei gebräuchlichen Insulin-Therapiestrategien über einen Therapietag hinweg als Hilfe für die praktische Anwendung dieser Strategien bei Patienten mit Typ 2 Diabetes im klinischen Alltag charakterisiert werden. Beide Insulin-Regime könnten am Ende einer Intensivierungsphase einer Insulin-Therapie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes stehen. Die Therapie mit dem Mischinsulin-Präparat hätte gegenüber der intensivierten Insulintherapie den Vorteil, dass nur drei (statt vier) Insulininjektionen erforderlich wären und auch nur ein Insulinpräparat verwendet würde, so dass es nicht zu Verwechslungen des Insulinpen bei der Injektion des lang- bzw. kurzwirkenden Präparates kommen könnte. Allerdings ist bei Mischinsulinen keine getrennte Anpassung von kurz- und langwirkendem Insulin möglich, und das "langwirkende", protaminierte Insulin wird dreimal täglich statt einmal täglich wie bei einer intensivierten Insulintherapie mit einem langwirkenden Insulin-Analogon gegeben. Von daher ist die Frage, ob es über 24 Stunden nicht

durch Akkumulation des langwirkenden Basalinsulins zu völlig anderen Wirkprofilen bei beiden Insulin-Regimen kommt, von hoher klinischer Relevanz.

In der Tat zeigt sich nach der dritten Insulininjektion des Mischinsulins eine deutlich stärkere Insulinwirkung als bei der intensivierten Insulintherapie über ca. 10 Stunden. Erst danach sind die Wirkprofile beider Insulintherapieformen wieder vergleichbar. In der Praxis bedeutet dies, dass Patienten bei dreimal täglicher Gabe von BIAsp30 nach dem Abendessen und über die Nacht (oder zumindest in den ersten Nachtstunden) ein erhöhtes Risiko von Hypoglykämien haben könnten. Wie groß dieses Risiko ist, wird im Einzelfall insbesondere von den Essgewohnheiten und der endogenen Insulinsekretionsreserve des individuellen Patienten abhängen. Eine dreimal tägliche Gabe von BIAsp30 dürfte für Patienten, die abends ihre Hauptmahlzeit einnehmen, gut geeignet sein. Auch Patienten mit noch gut erhaltener endogener Insulinsekretionsfähigkeit sollten in der Lage sein, das ausgeprägte Wirkmaximum nach der dritten Injektion durch eine Reduktion der endogenen Insulinausschüttung auszugleichen. In der Tat zeigen randomisierte, kontrollierte, klinische Studien, dass eine Intensivierung einer Insulintherapie mit einer dreimal täglichen Gabe von BIAsp30 bei Patienten, die unter zweimal täglicher Gabe eines Mischinsulins unzureichend eingestellt waren, einerseits zu einer signifikanten Verbesserung der Stoffwechsellage mit einer Verbesserung des HbA1c-Wertes von im Mittel mehr als 0,3% führt, andererseits aber auch die Inzidenz von Hypoglykämien (Blutglucosewerte < 50 mg/dl) erhöht [90]. Dagegen wurde in einer chinesischen Studie bei unter oralen Antidiabetika-Therapie unzureichend eingestellten Patienten, die randomisiert zweimal oder dreimal täglich BIAsp30 erhielten, ein ähnlich großer Vorteil der dreimal täglichen Gabe in Bezug auf die Stoffwechselkontrolle gesehen (der HbA1c-Unterschied betrug 0,33% zwischen beiden Behandlungsarmen), jedoch keine Unterschiede in der Hypoglykämie-Inzidenz [91]. Somit hatten die Patienten in dieser Studie, die als zuvor noch nicht mit Insulin behandelte Patienten vermutlich noch eine relativ gute Insulinsekretionsreserve hatten, durch das abendliche Wirkmaximum bei der dreimal täglichen Gabe kein erhöhtes Hypoglykämie-Risiko.

Dies wird bestätigt durch die zwei bislang publizierten klinischen Studien, die die dreimal tägliche Gabe von BIAsp mit einer intensivierten Insulintherapie vergleichen. In einer Studie wurden nahezu 400 insulinbehandelte Patienten mit Typ 2 Diabetes randomisiert über 16 Wochen mit einer dreimal täglichen Gabe von BIAsp30 oder mit einer intensivierten Insulintherapie (durchgeführt mit Insulin Aspart als prandialem und NPH-Insulin als Basalinsulin) behandelt [92]. Auch bei dieser Studie konnten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsformen gefunden werden. Sowohl HbA1c-Werte als auch die mittels 8-Punkt Blutzucker-Tagesprofilen ermittelten glykämischen Profile waren vergleichbar, und auch die Anzahl an Hypoglykämien zeigte keine Unterschiede. Allerdings wurde in dieser Studie bei der Mischinsulin-Therapie nur zum Abendessen BIAsp30 verwendet, zum Frühstück und Mittagessen wurden Misch-

insuline mit einem geringem Anteil an protaminierten Insulin Aspart verwendet (BIAsp50 (50% lösliches, 50% protaminiertes Insulin Aspart) bei Patienten mit einem BMI über 30 kg/m² und BIAsp70 (70% lösliches und 30% protaminiertes Insulin Aspart) bei Patienten mit einem BMI bis 30 kg/m²). Aufgrund der insgesamt niedrigeren Dosis von langwirksamen, protaminiertem Insulin Aspart dürfte die Überlappung der Wirkung der einzelnen Mischinsulin-Injektionen nicht so ausgeprägt gewesen sein wie in der vorliegenden Studie.

Die andere klinische Studie wurde interessanterweise bei Typ 1 Diabetikern, also Patienten ohne endogene Insulinsekretion durchgeführt [93]. Dreiundzwanzig Patienten wurden im Cross-over Verfahren über jeweils 12 Wochen mit BIAsp30 dreimal täglich oder mit einer intensivierten Insulintherapie mit humanem Insulin (Altinsulin vor den Mahlzeiten und NPH-Insulin vor dem Schlafengehen) behandelt. Es zeigte sich eine signifikant bessere HbA1c-Absenkung unter der Mischinsulintherapie (die HbA1c-Werte lagen bei Behandlungsende bei 8,3% (BIAsp30) bzw. 8,6% (intensivierte Insulintherapie)). Dies war vor allem auf eine in den durchgeführten Tagesprofilen nachweisbare signifikant stärkere Senkung der nächtlichen Blut-glucose-konzentrationen zurückzuführen. Die Hypoglykämie-Frequenz war bei beiden Insulintherapieformen vergleichbar. Am Ende beider Behandlungsphasen wurden auch pharmakokinetische Profile bestimmt. Dabei waren die Insulin(Aspart-)konzentrationen bei dreimal täglicher Gabe von BIAsp30 abends und nachts höher als bei der intensivierten Insulintherapie. Allerdings waren die Unterschiede relativ klein und nicht so stark ausgeprägt wie die in der vorliegenden Studie beobachteten Differenzen in den pharmakodynamischen Profilen. Dies dürfte auf die längere Wirkdauer von Altinsulin im Vergleich zu Insulin Glulisin [38] und auf den deutlich ausgeprägteren Wirkgipfel von NPH-Insulin im Vergleich zu Insulin Glargin [41;42] zurückzuführen sein.

Zusammenfassend wurden in dieser Studie erstmals Wirkprofile von Insulintherapiestrategien mit mehreren Insulinjektionen über einen Behandlungstag bei Patienten mit Typ 2 Diabetes erstellt. Im Vergleich zwischen einer Therapie mit einer dreimal täglichen Gabe des mit Insulin Aspart formulierten Mischinsulins BIAsp30 (Novomix30[®]) und einer intensivierten Insulintherapie mit dem kurzwirksamen Insulinanalogon Insulin Glulisin und dem basalen Insulinanalogon Insulin Glargin zeigten sich vergleichbare Wirkprofile in den ersten 12 Stunden. Nach der dritten Injektion von BIAsp30 war die Insulinwirkung jedoch über die nachfolgenden 10 Stunden stärker als mit der intensivierten Insulintherapie. Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Wirkprofile, die im Einklang mit publizierten klinischen Studien stehen, sollen als praktische Hilfe bei der individuellen Entscheidung für eine Insulintherapieform und bei der Optimierung der Insulintherapie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes dienen.

6. Zusammenfassung

Zur Diabetesbehandlung werden unterschiedliche Formen der Insulintherapie angewendet. Die intensivierte Insulintherapie wird bei insulinpflichtigen Diabetikern generell bevorzugt, da sie als am physiologischsten gilt und eine individuelle Titration von prandialem- und Basalinsulin erlaubt. Allerdings fordert sie auch eine erhebliche Mitarbeit des Patienten und die Bereitschaft zu mindestens vier Insulininjektionen pro Tag. Daher wird gerade bei älteren Patienten eine konventionelle Insulintherapie mit festen Mischungen von kurz- und langwirkenden Insulinen angewendet. Es war bislang jedoch unklar, ob nicht die Wirkprofile einer konventionellen Insulintherapie mit mehrmals täglicher Injektion eines Mischinsulins nicht deutliche Unterschiede zum Wirkprofil einer intensivierten Insulintherapie über einen Therapietag aufweist.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden in dieser Studie mit Hilfe der euglykämischen Glucose-Clamptechnik erstmalig pharmakodynamische Wirkprofile beider Therapieformen (einerseits konventionelle Insulintherapie mit dreimal täglicher Verabreichung von biphasischem Insulin Aspart 30 (Mischinsulin mit 30% Insulin Aspart und 70% protaminiertem Insulin Aspart und andererseits intensivierte Insulintherapie mit einmal täglicher Gabe des Basalinsulinanalogons Insulin Glargin und dreimal täglicher Applikation des kurzwirkenden Insulinanalogons Insulin Glulisin) über 24 Stunden angefertigt.

Es handelte sich um eine offene, randomisierte, zweifache Cross-over Studie, in welche 24 Patienten mit Diabetes Typ II im Alter von 18 bis 65 Jahren eingeschlossen wurden. Sie sollten seit mindestens 3 Monaten ausschliesslich mit Insulin behandelt werden (Tagesdosis 0,6 -0,9 Einheiten/kg), einen Body Mass Index zwischen 25 und 40 kg/m² und einen HbA1c-Wert zwischen 7 und 10,5 % aufweisen. Patienten mit Herz-, Nieren- oder Leberinsuffizienz, häufigen Hypoglykämien oder Anämie oder unter Therapie mit den Glukose-Stoffwechsel beeinflussenden Medikamente waren von der Teilnahme ausgeschlossen.

Die pharmakodynamischen Wirkprofile wurden in zwei Dosierungsvisiten über 30 Stunden mit Hilfe der Glucose-Clamp-Technik erstellt. Dabei wurde der Blutzucker auf einem euglykämischen Wert konstant gehalten und die Blutzucker-senkende Wirkung der Studienmedikation durch Infusion von Glucose antagonisiert. Die Glucoseinfusionsrate stellt somit ein indirektes Maß der Wirkung der Studienmedikation dar. Die Studienmedikation wurde in identischer Tagesdosis verabreicht. Bei der konventionellen Insulintherapie wurden jeweils 40% der Insulintagesdosis morgens um 7 Uhr und abends 19 Uhr verabreicht, sowie 20% mittags um 13 Uhr. Bei der intensivierten Insulintherapie entfiel 60% der Tagesdosis auf Insulin Glargin, verabreicht um 23 Uhr. Die verbleibenden 40% wurden gleichmäßig auf die 3 Injektionen von Insulin Glulisin aufgeteilt, so dass um 7, 13 und 19 Uhr jeweils 13,3% der Tagesdosis verabreicht wurden. Um Steady-State Bedingungen zu simulieren, wurde am Vorabend des Glucose-Clampversuchs noch eine Injektion des Mischinsulins (40% der Tagesdosis, verabreicht um 19 Uhr) bzw. des Basalinsulins (60% der Tagesdosis, verabreicht um 23 Uhr) appliziert.

Beide Insulintherapieformen zeigten vergleichbare Wirkprofile in den ersten 12 Stunden der Untersuchung. Nach der dritten Injektion des Mischinsulins fand sich allerdings ein signifikanter Unterschied mit einer deutlich höheren Insulinwirkung bei der konventionellen Insulintherapie als mit der intensivierten Insulintherapie.

Die Ergebnisse der Studie sind klinisch relevant, da erstmalig eine Akkumulation der Wirkung bei konventioneller Insulintherapie über den Tag hinweg gezeigt wurde. Dies sollte bei der individuellen Dosisberechnung beachtet werden, da sonst mit erhöhtem Risiko von Hypoglykämien in der ersten Nachthälfte zu rechnen wäre.

7. Literatur

1. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Heine RJ, Holman RR, Sherwin R, Zinman B. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy : A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* 2006; 49: 1711-1721
2. Deutsche Evidenz-basierte Diabetes Leitlinien -DDG- Diskussionsentwurf: Therapieziele und Behandlungsstrategien beim Diabetes mellitus. *Diabetes u Stoffw* 1999; 8 (Suppl. 3): 25-36
3. Koro CE, Bowlin SJ, Bourgeois N, Fedder DO. Glycemic control from 1988 to 2000 among U.S. adults diagnosed with type 2 diabetes: a preliminary report. *Diabetes Care* 2004; 27: 17-20
4. Liebl A, Neiss A, Spannheimer A, Reitberger U, Wieseler B, Stammer H, Goertz A. Complications, co-morbidity, and blood glucose control in type 2 diabetes mellitus patients in Germany--results from the CODE-2 study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002; 110: 10-16
5. Lauritzen T. Pharmacokinetic and clinical aspects of intensified subcutaneous insulin therapy. *Dan Med Bull* 1985; 32: 104-118
6. Peyrot M, Rubin RR, Lauritzen T, Skovlund SE, Snoek FJ, Matthews DR, Landgraf R, Kleinebreil L. Resistance to insulin therapy among patients and providers: results of the cross-national Diabetes Attitudes, Wishes, and Needs (DAWN) study. *Diabetes Care* 2005; 28: 2673-2679
7. Zambanini A, Newson RB, Maisey M, Feher MD. Injection related anxiety in insulin-treated diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 46: 239-246
8. Peyrot M, Rubin RR, Khunti K. Addressing barriers to initiation of insulin in patients with type 2 diabetes. *Prim Care Diabetes* 2010; 4 (Suppl. 1): S11-S18
9. Crasto W, Jarvis J, Khunti K, Davies MJ. New insulins and new insulin regimens: a review of their role in improving glycaemic control in patients with diabetes. *Postgrad Med J* 2009; 85: 257-267
10. Holman RR, Thorne KI, Farmer AJ, Davies MJ, Keenan JF, Paul S, Levy JC. Addition of biphasic, prandial, or basal insulin to oral therapy in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2007; 357: 1716-1730
11. Holman RR, Farmer AJ, Davies MJ, Levy JC, Darbyshire JL, Keenan JF, Paul SK. Three-year efficacy of complex insulin regimens in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2009; 361: 1736-1747

12. Davies MJ, Derezinski T, Pedersen CB, Clauson P. Reduced weight gain with insulin detemir compared to NPH insulin is not explained by a reduction in hypoglycemia. *Diabetes Technol Ther* 2008; 10: 273-277
13. DeVries JH, Natrass M, Pieber TR. Refining basal insulin therapy: what have we learned in the age of analogues? *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 441-454
14. Kabadi UM. Starting insulin in type 2 diabetes: Overcoming barriers to insulin therapy. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2008; 28: 65-68
15. Riddle MC. Making the transition from oral to insulin therapy. *Am J Med* 2005; 118 (Suppl. 5A): 14S-20S
16. Hirsch IB, Vega CP. Optimal initiation of insulin in type 2 diabetes. *MedGenMed* 2005; 7: 49
17. Weyer C, Borgardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1999; 104: 787-794
18. Garber AJ, Wahlen J, Wahl T, Bressler P, Braceras R, Allen E, Jain R. Attainment of glycaemic goals in type 2 diabetes with once-, twice-, or thrice-daily dosing with biphasic insulin aspart 70/30 (The 1-2-3 study). *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 58-66
19. Heise T, Heinemann L. Rapid and long-acting analogues as an approach to improve insulin therapy: an evidence-based medicine assessment. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 1303-1325
20. Heinemann L, Weyer C, Rauhaus M, Heinrichs S, Heise T. Variability of the metabolic effect of soluble insulin and the rapid -acting insulin analog insulin aspart. *Diabetes Care* 1998; 21: 1910-1914
21. Nosek, L., Heinemann, L, Kaiser, M., Arnolds, S., and Heise, T. No increase in the duration of action with rising doses of insulin aspart (abstract). *Diabetes* 2003; 52 (Suppl 1): 551-P
22. Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 1988; 81: 442-448
23. Heise T, Nosek L, Ronn BB, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E. Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 1614-1620

24. Heise T, Pieber TR. Towards peakless, reproducible and long-acting insulins. An assessment of the basal analogues based on isoglycaemic clamp studies. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 648-659
25. Agin A, Jeandidier N, Gasser F, Grucker D, Sapin R. Glargine blood biotransformation: in vitro appraisal with human insulin immunoassay. *Diabetes Metab* 2007; 33: 205-212
26. Kuerzel GU, Shukla U, Scholtz HE, Pretorius SG, Wessels DH, Venter C, Potgieter MA, Lang AM, Koose T, Bernhardt E. Biotransformation of insulin glargine after subcutaneous injection in healthy subjects. *Curr Med Res Opin* 2003; 19: 34-40
27. Kurtzhals P. Engineering predictability and protraction in a basal insulin analogue: the pharmacology of insulin detemir. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28 Suppl 2: S23-S28
28. Heise T, Tack CJ, Cuddihy R, Davidson J, Gouet D, Liebl A, Romero E, Mersebach H, Dykiel P, Jorde R. A new-generation ultra-long-acting basal insulin with a bolus boost compared with insulin glargine in insulin-naive people with type 2 diabetes: a randomized, controlled trial. *Diabetes Care* 2011; 34: 669-674
29. Rave K, Heise T, Weyer C, Herrnberger J, Bender R, Hirschberger S, Heinemann L. Intramuscular versus subcutaneous injection of soluble and lispro insulin: comparison of metabolic effects in healthy subjects. *Diabet Med* 1998; 15: 747-751
30. Home PD, Barriocanal L, Lindholm A. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel rapid-acting insulin analogue, insulin aspart, in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 199-203
31. Heinemann L, Woodworth JR. Insulin Lispro; Chapter III: Pharmacokinetics and Metabolism of Insulin Lispro. *Drugs of Today* 1998; 34 (Suppl. C): 23-36
32. Plank J, Wutte A, Brunner G, Siebenhofer A, Semlitsch B, Sommer R, Hirschberger S, Pieber TR. A direct comparison of insulin aspart and insulin lispro in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 2053-2057
33. Heinemann L, Weyer C, Rave K, Stiefelhagen O, Rauhaus M, Heise T. Comparison of the time-action profiles of U40- and U100-regular human insulin and the rapid-acting insulin analogue B28 Asp. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105: 140-144
34. Mudaliar SR, Lindberg FA, Joyce M, Beerdsen P, Strange P, Lin A, Henry RR. Insulin aspart (B28 asp-insulin): a fast-acting analog of human insulin: absorption kinetics and action profile compared with regular human insulin in healthy nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 1999; 22: 1501-1506

35. Becker RH, Frick AD, Nosek L, Heinemann L, Rave K. Dose-response relationship of insulin glulisine in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 2506-2507
36. Horvath K, Bock G, Regittnig W, Bodenlenz M, Wutte A, Plank J, Magnes C, Sinner F, Furst-Recktenwald S, Theobald K, Pieber TR. Insulin glulisine, insulin lispro and regular human insulin show comparable end-organ metabolic effects: an exploratory study. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 484-491
37. Krones R, Schütte C, Heise T. The rapid-acting properties of insulin aspart are preserved in elderly people with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11: 41-44
38. Becker RH, Frick AD, Burger F, Potgieter JH, Scholtz H. Insulin glulisine, a new rapid-acting insulin analogue, displays a rapid time-action profile in obese non-diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005; 113: 435-443
39. Heise T, Nosek L, Spitzer H, Heinemann L, Niemoller E, Frick AD, Becker RH. Insulin glulisine: a faster onset of action compared with insulin lispro. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 746-753
40. Arnolds S, Rave K, Hövelmann U, Fischer A, Sert-Langeron C, Heise T. Insulin glulisine has a faster onset of action compared with insulin aspart in healthy volunteers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 118: 662-664
41. Heinemann L, Linkeschova R, Rave K, Hompesch B, Sedlak M, Heise T. Time-action profile of the long-acting insulin analog insulin glargine (HOE901) in comparison with those of NPH insulin and placebo. *Diabetes Care* 2000; 23: 644-649
42. Lepore M, Pampanelli S, Fanelli C, Porcellati F, Bartocci L, Di Vincenzo A, Cordoni C, Costa E, Brunetti P, Bolli GB. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous injection of long-acting human insulin analog glargine, NPH insulin, and ultralente human insulin and continuous subcutaneous infusion of insulin lispro. *Diabetes* 2000; 49: 2142-2148
43. Scholtz HE, Pretorius SG, Wessels DH, Becker RH. Pharmacokinetic and glucodynamic variability: assessment of insulin glargine, NPH insulin and insulin ultralente in healthy volunteers using a euglycaemic clamp technique. *Diabetologia* 2005; 48: 1988-1995
44. Heinemann L, Sinha K, Weyer C, Loftager M, Hirschberger S, Heise T. Time-action profile of the soluble, fatty acid acylated, long-acting insulin analogue NN304. *Diabet Med* 1999; 16: 332-338
45. Plank J, Bodenlenz M, Sinner F, Magnes C, Gorzer E, Regittnig W, Endahl LA, Draeger E, Zdravkovic M, Pieber TR. A double-blind, randomized, dose-response study investigating the pharmacodynamic and pharmacokinetic

- properties of the long-acting insulin analog detemir. *Diabetes Care* 2005; 28: 1107-1112
46. Porcellati F, Rossetti P, Busciantella NR, Marzotti S, Lucidi P, Luzio S, Owens DR, Bolli GB, Fanelli CG. Comparison of pharmacokinetics and dynamics of the long-acting insulin analogs glargine and detemir at steady state in type 1 diabetes: a double-blind, randomized, crossover study. *Diabetes Care* 2007; 30: 2447-2452
 47. Bock, G., Wutte, A., Köhler, G., Korsatko, S., Semlitsch, B., and Pieber, T. R. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of long-acting insulin analogues detemir and glargine after 7 days of use and after its first administration in subjects with type 1 diabetes (abstract). *Diabetologia* 2008; 51 (Suppl. 1): S390
 48. Klein O, Lyngé J, Endahl L, Damholt B, Nosek L, Heise T. Albumin-bound basal insulin analogues (insulin detemir and NN344): comparable time-action profiles but less variability than insulin glargine in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 290-299
 49. McMahon GT, Dluhy RG. Intention to treat--initiating insulin and the 4-T study. *N Engl J Med* 2007; 357: 1759-1761
 50. Owens DR, Bolli GB. Beyond the era of NPH insulin. Long-acting insulin analogs: Chemistry, comparative pharmacology, and clinical application. *Diabetes Technol Ther* 2008; 10: 333-349
 51. Heise T, Weyer C, Serwas A, Heinrichs S, Osinga J, Roach P, Woodworth J, Gudat U, Heinemann L. Time-action profiles of novel premixed preparations of insulin lispro and NPL insulin. *Diabetes Care* 1998; 21: 800-803
 52. Weyer C, Heise T, Heinemann L. Insulin aspart in a 30/70 premixed formulation. Pharmacodynamic properties of a rapid-acting insulin analog in stable mixture. *Diabetes Care* 1997; 20: 1612-1614
 53. Rave K, Heinemann L, Puhl L, Gudat U, Woodworth JR, Weyer C, Heise T. Premixed formulations of insulin lispro. Activity profiles in type 1 diabetic patients [letter]. *Diabetes Care* 1999; 22: 865-866
 54. Davis SN, Thompson CJ, Brown MD, Home PD, Alberti KG. A comparison of the pharmacokinetics and metabolic effects of human regular and NPH insulin mixtures. *Diabetes Res Clin Pract* 1991; 13: 107-117
 55. Heinemann L, Anderson JH, Jr. Measurement of insulin absorption and insulin action. *Diabetes Technol Ther* 2004; 6: 698-718
 56. Bott S, Tusek C, Jacobsen LV, Endahl L, Draeger E, Kapitza C, Heise T. Insulin detemir under steady-state conditions: no accumulation and constant metabolic effect over time with twice daily administration in subjects with Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2006; 23: 522-588

57. Porcellati F, Rossetti P, Ricci NB, Pampanelli S, Torlone E, Campos SH, Andreoli AM, Bolli GB, Fanelli CG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the long-acting insulin analog glargine after 1 week of use compared with its first administration in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 1261-1263
58. Bott S, Tusek C, Heinemann L, Friberg HH, Heise T. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of biphasic insulin aspart 70 (BIAsp 70) are significantly different from those of biphasic insulin aspart 30 (BIAsp 30). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005; 113: 545-550
59. Raslova K, Bogoev M, Raz I, Leth G, Gall MA, Hancu N. Insulin detemir and insulin aspart: a promising basal-bolus regimen for type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66: 193-201
60. Heinemann L, Ampudia J. Glucose clamps with the Biostator: a critical reappraisal. *Horm Metab Res* 1994; 26: 579-583
61. McGuire EA, Helderman JH, Tobin JD, Andres R, Berman M. Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *J Appl Physiol* 1976; 41: 565-573
62. Liu D, Moberg E, Kollind M, Lins PE, Adamson U, Macdonald IA. Arterial, arterialized venous, venous and capillary blood glucose measurements in normal man during hyperinsulinaemic euglycaemia and hypoglycaemia. *Diabetologia* 1992; 35: 287-290
63. Heise T, Eckers U, Kanc K, Nielsen JN, Nosek L. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of different formulations of biphasic insulin aspart: a randomized, glucose clamp, crossover study. *Diabetes Technol Ther* 2008; 10: 479-485
64. van Avendonk MJ, Rutten GE. Insulin therapy in type 2 diabetes: what is the evidence? *Diabetes Obes Metab* 2009; 11: 415-432
65. Christiansen JS, Liebl A, Davidson JA, Ligthelm RJ, Halimi S. Mid- and high-ratio premix insulin analogues: potential treatment options for patients with type 2 diabetes in need of greater postprandial blood glucose control. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12: 105-114
66. Kumar A, Kalra S. Insulin initiation and intensification: insights from new studies. *J Assoc Physicians India* 2011; 59 Suppl: 17-22
67. Nosek, L., Heinemann, L, Kaiser, M., Arnolds, S., and Heise, T. No increase in the duration of action with rising doses of insulin aspart (abstract). *Diabetes* 2003; 52 (Suppl 1): 551-P

68. Wang Z, Hedrington MS, Gogitidze JN, Briscoe VJ, Richardson MA, Younk L, Nicholson W, Tate DB, Davis SN. Dose-response effects of insulin glargine in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33: 1555-1560
69. Birkeland KI, Kilhovd B, Thorsby P, Torjesen PA, Ganss R, Vaaler S, Hanssen KF. Heterogeneity of non-insulin-dependent diabetes expressed as variability in insulin sensitivity, beta-cell function and cardiovascular risk profile. *Diabet Med* 2003; 20: 37-45
70. Pitsillides AN, Anderson SM, Kovatchev B. Hypoglycemia risk and glucose variability indices derived from routine self-monitoring of blood glucose are related to laboratory measures of insulin sensitivity and epinephrine counterregulation. *Diabetes Technol Ther* 2011; 13: 11-17
71. Balkau B, Mhamdi L, Oppert JM, Nolan J, Golay A, Porcellati F, Laakso M, Ferrannini E. Physical activity and insulin sensitivity: the RISC study. *Diabetes* 2008; 57: 2613-2618
72. Du H, van der AD, van Bakel MM, van der Kallen CJ, Blaak EE, van Greevenbroek MM, Jansen EH, Nijpels G, Stehouwer CD, Dekker JM, Feskens EJ. Glycemic index and glycemic load in relation to food and nutrient intake and metabolic risk factors in a Dutch population. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 655-661
73. Tzima N, Pitsavos C, Panagiotakos DB, Skoumas J, Zampelas A, Chrysohoou C, Stefanadis C. Mediterranean diet and insulin sensitivity, lipid profile and blood pressure levels, in overweight and obese people; the Attica study. *Lipids Health Dis* 2007; 6: 22
74. Alvarez JA, Ashraf A. Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol* 2010; 2010: 351385
75. Heinemann L, Weyer C, Rauhaus M, Heinrichs S, Heise T. Variability of the metabolic effect of soluble insulin and the rapid- acting insulin analog insulin aspart. *Diabetes Care* 1998; 21: 1910-1914
76. Becker RH, Frick AD, Teichert L, Nosek L, Heinemann L, Heise T, Rave K. Fluctuation and reproducibility of exposure and effect of insulin glargine in healthy subjects. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 1105-1113
77. Bolli GB, Luzio S, Marzotti S, Porcellati F, Sert-Langeron C, Charbonnel B, Zair Y, Owens DR. Comparative pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics of subcutaneous insulin glulisine and insulin aspart prior to a standard meal in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 251-257
78. Arnolds S, Kuglin B, Kapitza C, Heise T. How pharmacokinetic and pharmacodynamic principles pave the way for optimal basal insulin therapy in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract* 2010; 64: 1415-1424

79. Swinnen SG, Holleman F, DeVries JH. The interpretation of glucose clamp studies of long-acting insulin analogues: from physiology to marketing and back. *Diabetologia* 2008; 51: 1790-1795
80. Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicines Agency. Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment of diabetes mellitus (CPMP/EWP/1080/00 Rev. 1). Draft. 16.9.2011. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/10/WC500115945.pdf, Zugriff vom 27.10.2011
81. Bolli GB, Andreoli AM, Lucidi P. Optimizing the replacement of basal insulin in type 1 diabetes mellitus: no longer an elusive goal in the post-NPH era. *Diabetes Technol Ther* 2011; 13 Suppl 1: S43-S52
82. Soon, D. K. W., Yeo, K. P., Chan, C., de la Pena, A, Ernest, C. S., Lim, M., and WISE, S. D. The use of basal insulin infusion in a glucose clamp alters the late glucodynamic profile of NPH insulin (abstract). *Diabetologia* 2004; 47 (Suppl. 1): A272-A273
83. Brunner GA, Sendhofer G, Wutte A, Ellmerer M, Sogaard B, Siebenhofer A, Hirschberger S, Krejs GJ, Pieber TR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of long-acting insulin analogue NN304 in comparison to NPH insulin in humans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: 100-105
84. Wutte, A., Plank, J., Sinner, F., Drumi, T., Sommer, R., Zdravkovic, M., Ronn, B. B., Draeger, E., and Pieber, T. R. Dose-response relationship and within-subject variability of insulin detemir and NPH insulin in subjects with Type 1 diabetes (abstract). *Diabetes* 2004; 53 (Suppl.2): A152
85. Heinemann L, Kapitza C, Starke AA, Heise T. Time-action profile of the insulin analogue B28Asp [letter]. *Diabet Med* 1996; 13: 683-684
86. Heinemann L, Heise T, Jorgensen LN, Starke AA. Action profile of the rapid acting insulin analogue: human insulin B28Asp. *Diabet Med* 1993; 10: 535-539
87. Heinemann L, Heise T, Klepper A, Ampudia J, Bender R, Starke AA. Time-action profiles of the intermediate-acting insulin analogue des(64,65)-human proinsulin. *Diabete Metab* 1995; 21: 415-419
88. Heinemann L, Breuer J, Cebulla D, Wüssel B, Bender R, Heise T. Wirkungsprofile von Normalinsulin, NPH-Insulin sowie einer 25/75-Mischung hergestellt aus gentechnologischem bzw. semisynthetischen Humaninsulin. *Diabetes u Stoffw* 1996; 5: 157-163
89. Luzio S, Dunseath G, Peter R, Pauvaday V, Owens DR. Comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of biphasic insulin aspart and insulin glargine in people with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006; 49: 1163-1168

90. Clements MR, Tits J, Kinsley BT, Rastam J, Friberg HH, Ligthelm RJ. Improved glycaemic control of thrice-daily biphasic insulin aspart compared with twice-daily biphasic human insulin; a randomized, open-label trial in patients with type 1 or type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 229-237
91. Yang W, Ji Q, Zhu D, Yang J, Chen L, Liu Z, Yu D, Yan L. Biphasic insulin aspart 30 three times daily is more effective than a twice-daily regimen, without increasing hypoglycemia, in Chinese subjects with type 2 diabetes inadequately controlled on oral antidiabetes drugs. *Diabetes Care* 2008; 31: 852-856
92. Ligthelm RJ, Mouritzen U, Lynggaard H, Landin-Olsson M, Fox C, le DC, Romero E, Liebl A. Biphasic insulin aspart given thrice daily is as efficacious as a basal-bolus insulin regimen with four daily injections: a randomised open-label parallel group four months comparison in patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 511-519
93. Chen JW, Lauritzen T, Bojesen A, Christiansen JS. Multiple mealtime administration of biphasic insulin aspart 30 versus traditional basal-bolus human insulin treatment in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 682-689

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Doktor Tim Heise, er hat maßgeblichen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit durch seine hilfsbereite und gewissenhafte Unterstützung, der Beratung während der Anfertigung der Dissertation und die ausführliche und kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ihm verdanke ich die Möglichkeit der Mitarbeit im Institut von Profil während der klinischen Phase.

Frau Doktor Ulrike Hövelmann und den übrigen Mitgliedern des medizinischen Teams danke ich vielmals für die freundliche Aufnahme und stete fachliche Begleitung während meiner Tätigkeit.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Professor Werner Scherbaum für die Überlassung des Themas und die Durchsicht der Arbeit bedanken.

Herrn Doktor Leszek Nosek gilt für den reibungslosen Ablauf des stationären Aufenthaltes der Probanden und deren Komfort mein Dank.

Bei Sandra Beyer möchte ich mich ganz herzlich für die praktische Unterstützung bei der Erstellung der Excel-Dateien und der Auswertung der Daten bedanken.

Herrn Sascha Heckermann danke ich für die Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Allen Mitgliedern des Profil-Institutes Neuss ein herzliches Dankeschön für ihre stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Schwester für ihr Interesse am Fortgang der Arbeit und ihre Anteilnahme bedanken.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Marie Bianca Brauns
Geburtsdatum und Ort	15.11.1973 Wurzen
Anschrift	132, avenue de la Libération 63000 Clermont Ferrand, France
e-mail	biancabrauns@yahoo.fr
Familienstand	ledig

Schulbildung

1980 –1992 Grundschule Machern und Gymnasium Wurzen
Abschluss Abitur (1,9)

Studium

1993 – 1995 Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
1995 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
2002 – 2003 Arzt im Praktikum

Approbation November 2003

2003 – 2004 Assistenzärztin im Marienkrankenhaus in Wadern
2005 – 2010 Assistenzärztin in Frankreich (Clamart; Clichy; Longjumeau; Corbeil)

Facharztprüfung für Innere Medizin am 8.10.2010 in Dresden

Seit 2010 Ärztin im öffentlichen Krankenhaus in Frankreich (CHI Villeneuve St. Georges, CHR Roanne)

Qualifikation

2006 Ultraschallkurs (Abdomen, Schilddrüse, Gefäße)
2007 experimenteller Teil der Promotion
(Charakterisierung des Gesamt-Wirkprofils einer intensivierten Insulintherapie und einer Mischinsulin-Therapie)
2010/2011 Ultraschallkurs des Herzens

Kenntnisse in Schrift und Sprache in Französisch und Englisch

10. Leistungen der Promovendin

Die Promovendin war an der Studiendurchführung, insbesondere an der Rekrutierung der Patienten und der Durchführung der Glucose-Clamp-Experimente, sowie an der Auswertung der Daten (über die im Studienreport vorgenommene Auswertung hinaus) beteiligt.

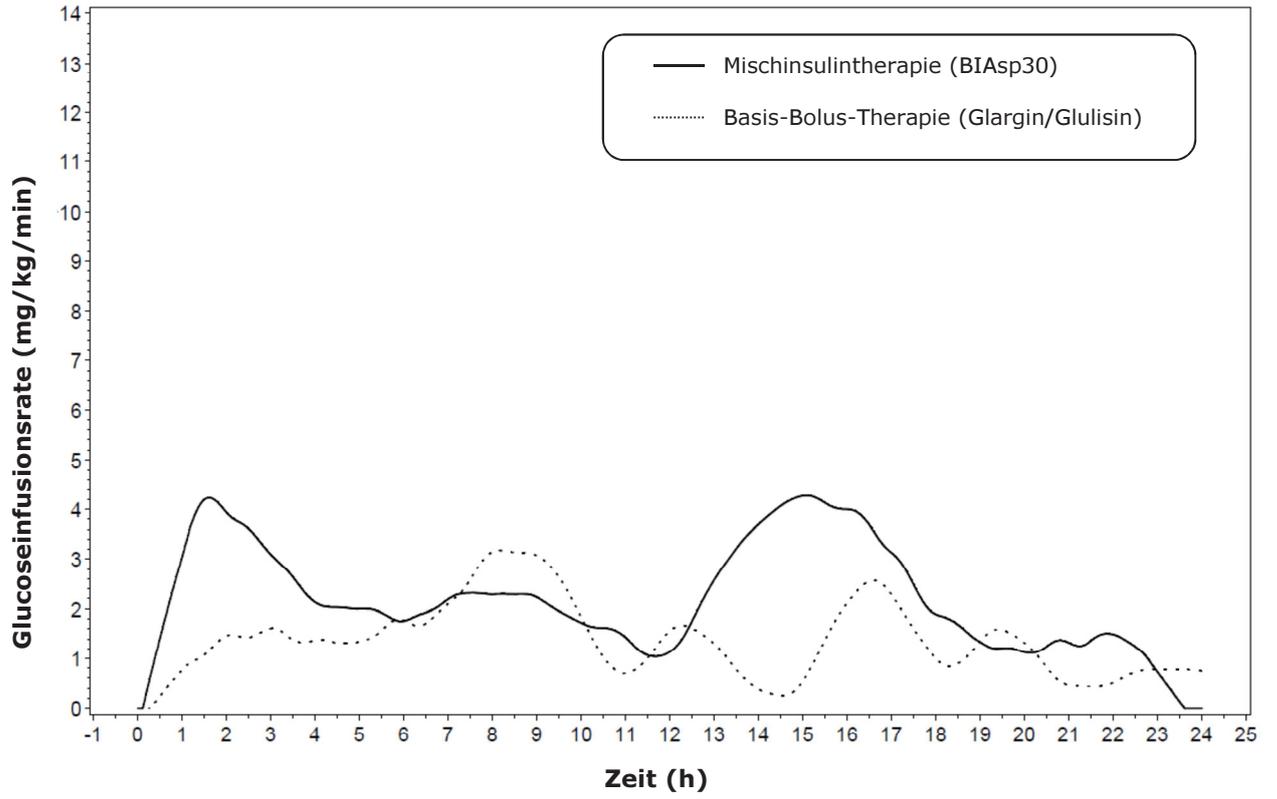
11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

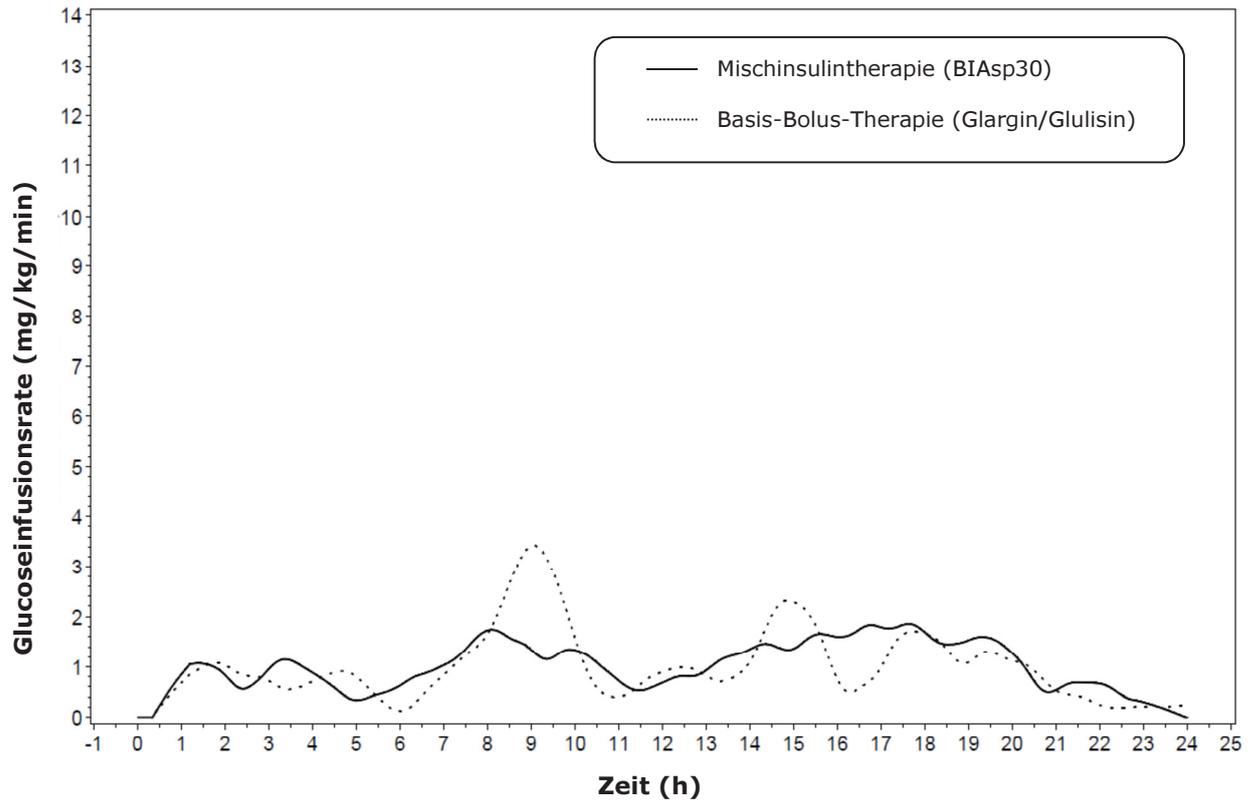
15. Februar 2013, Marie Bianca Brauns

Anhang 1: Individuelle Wirkprofile

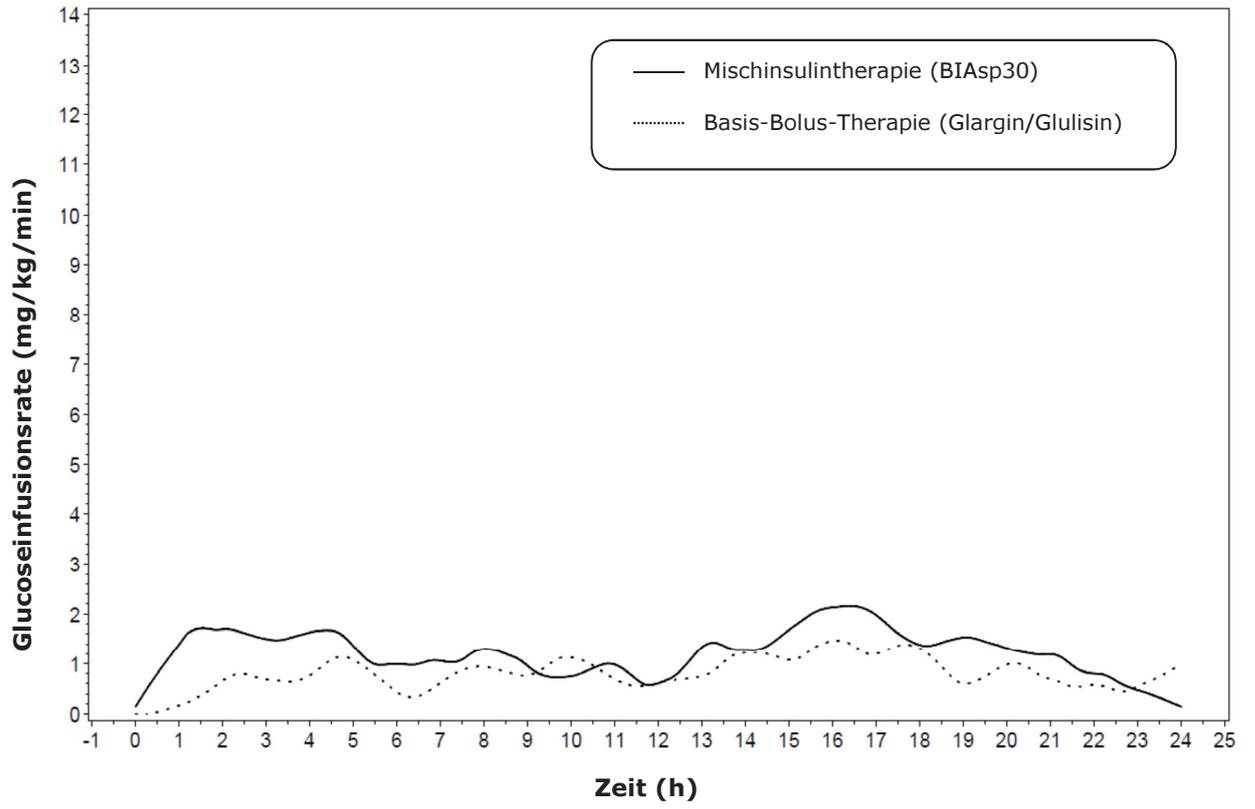
Patient 001



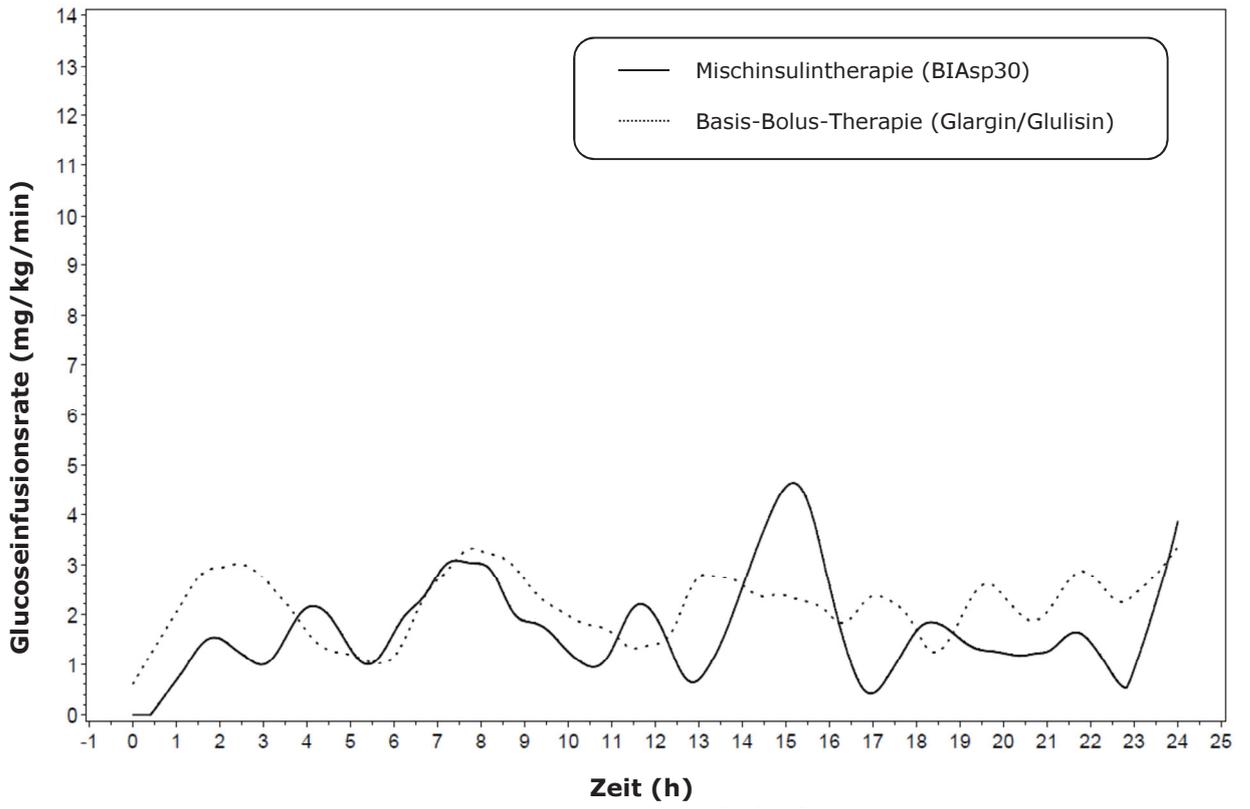
Patient 004



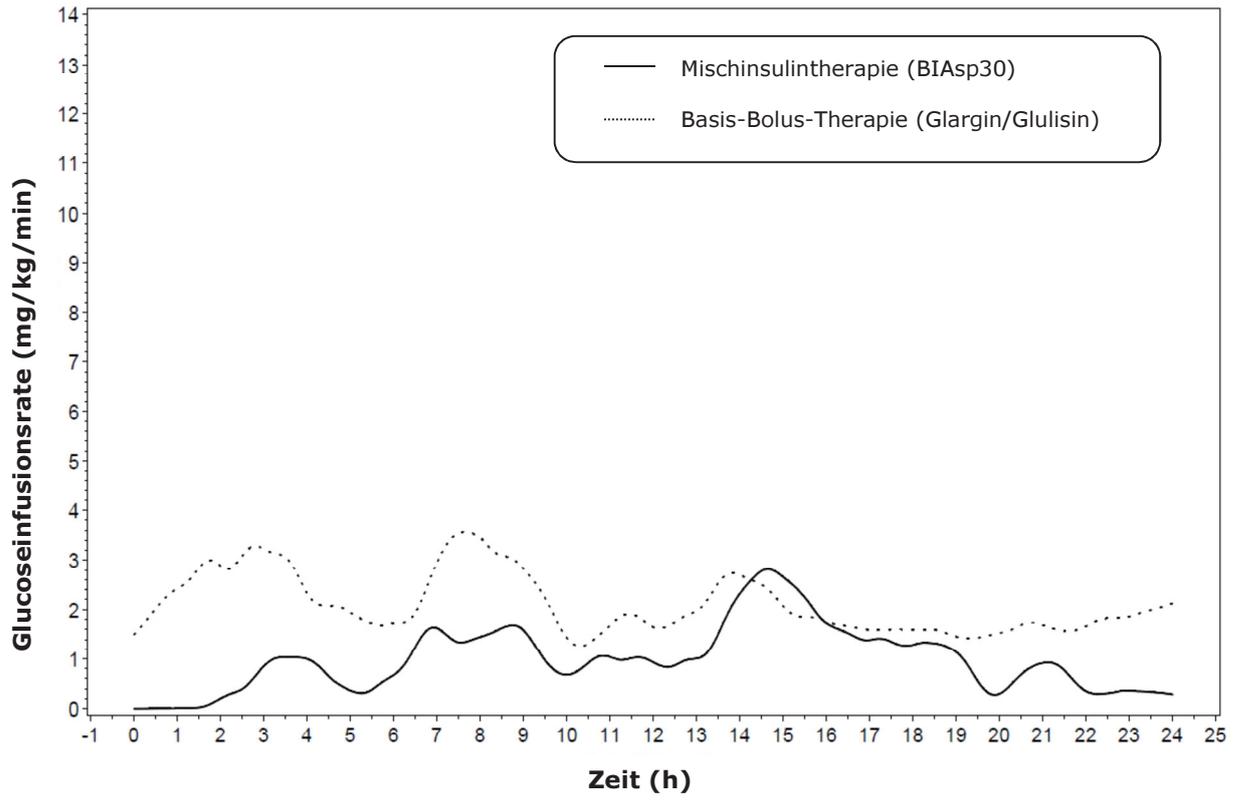
Patient 005



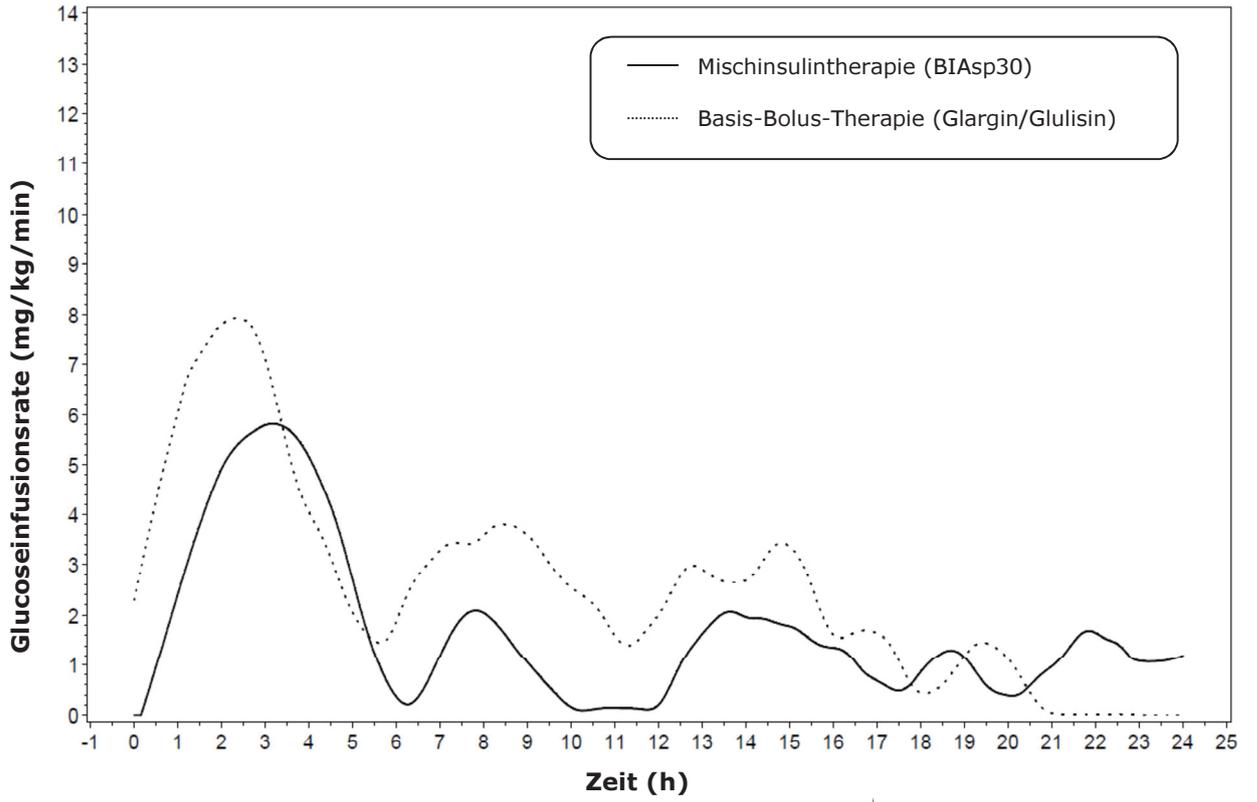
Patient 006



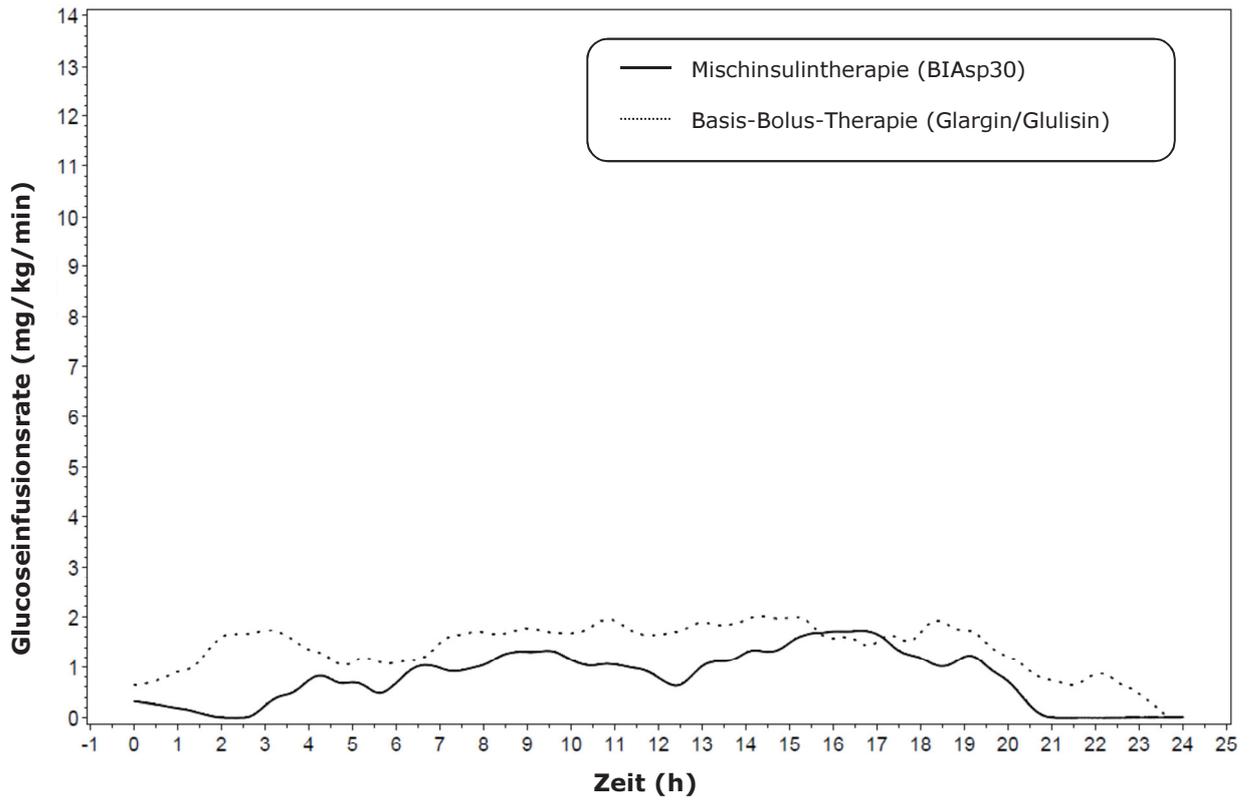
Patient 007



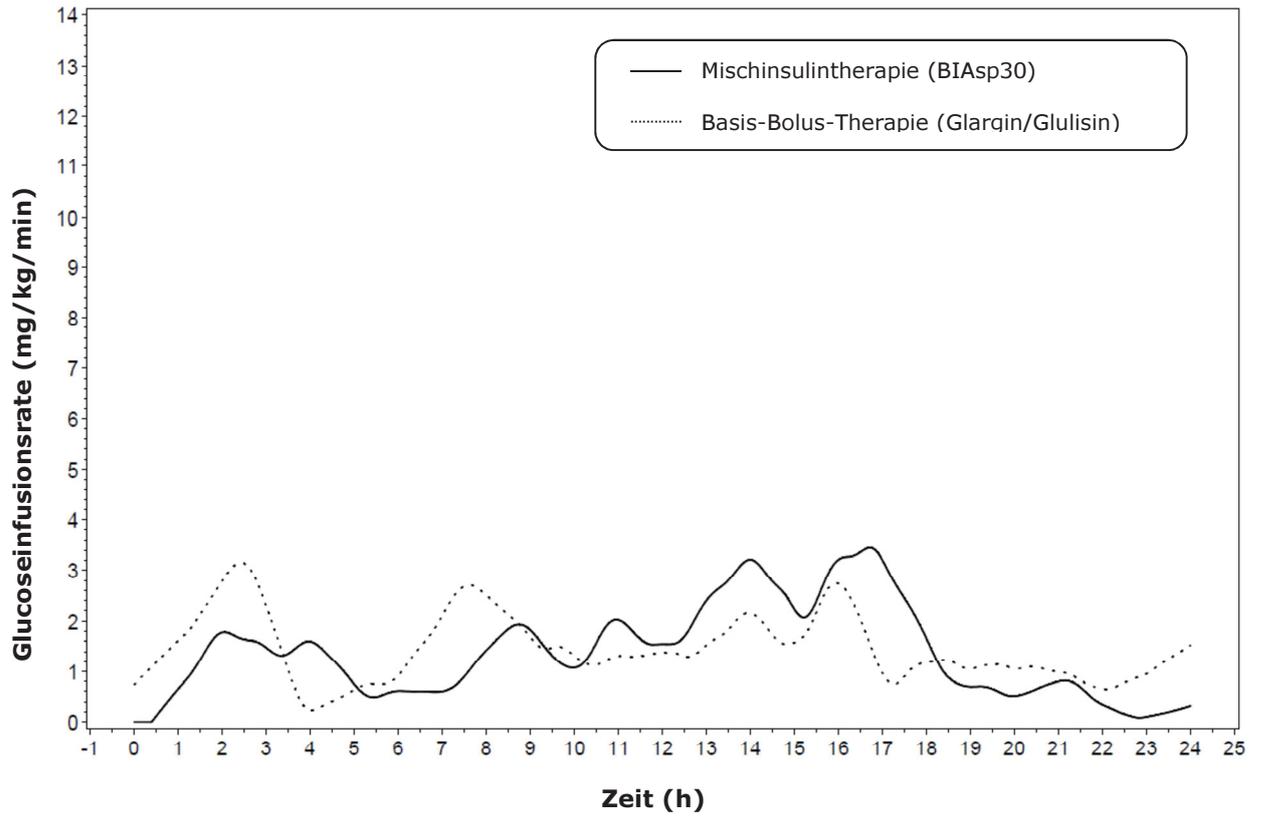
Patient 010



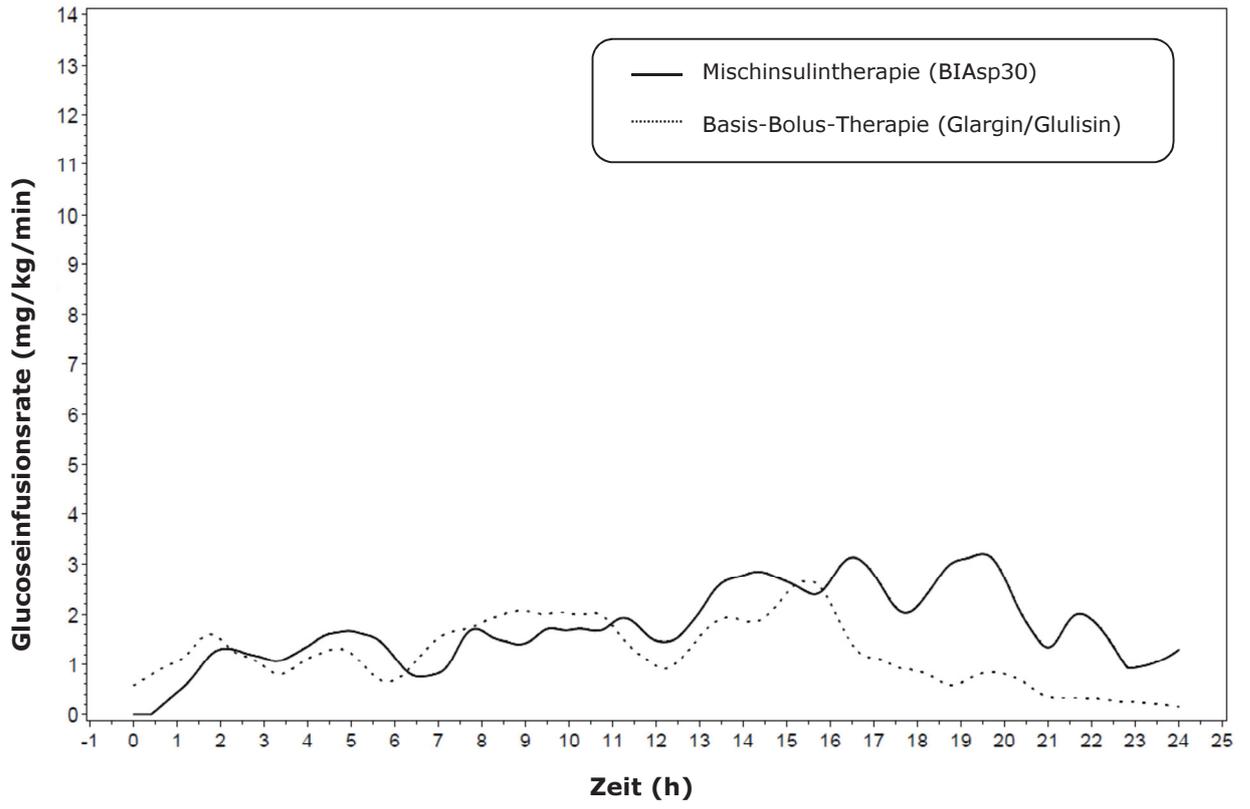
Patient 011



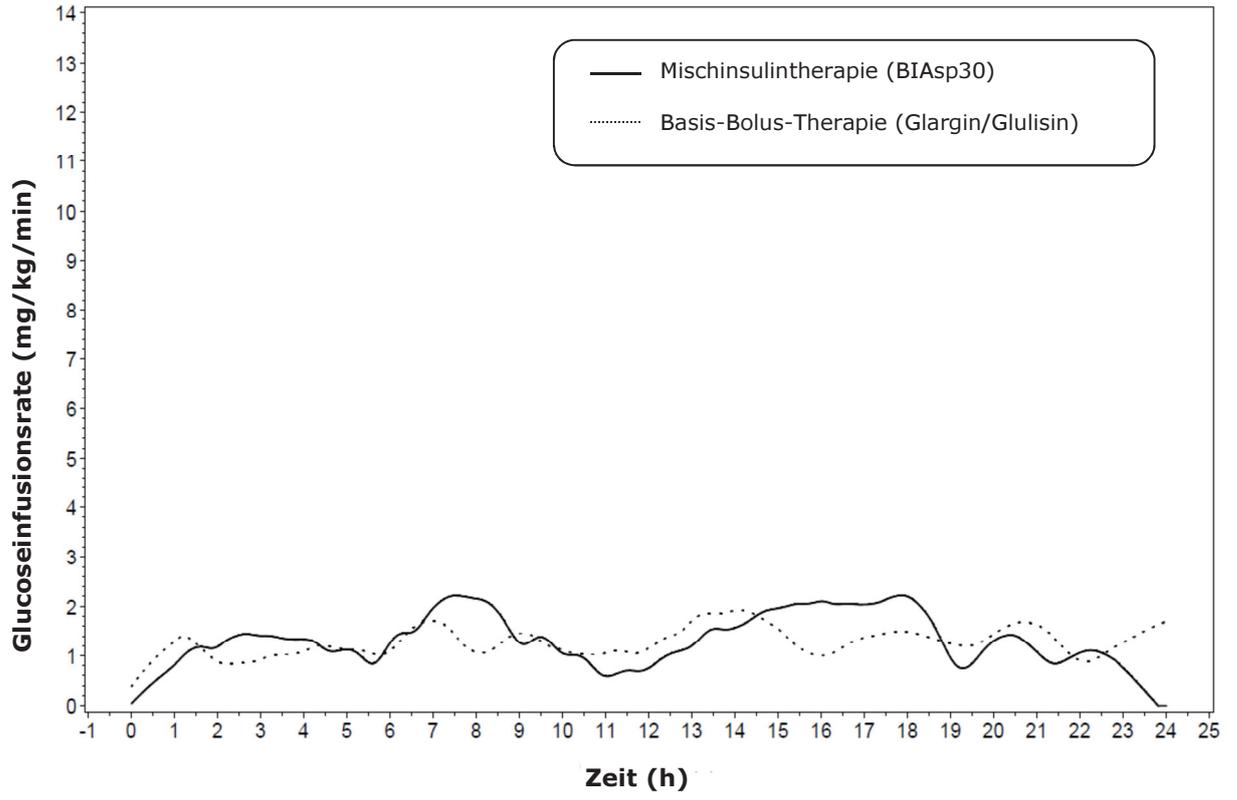
Patient 012



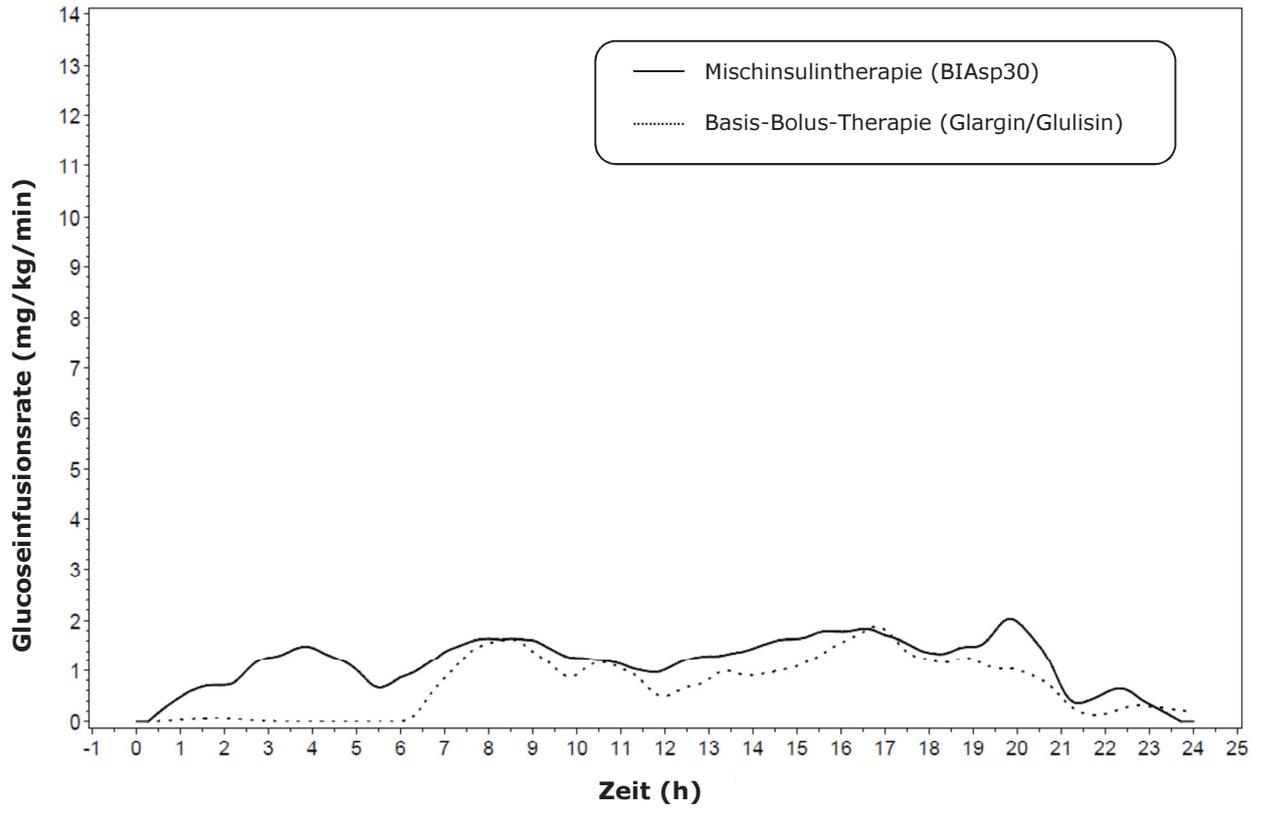
Patient 013



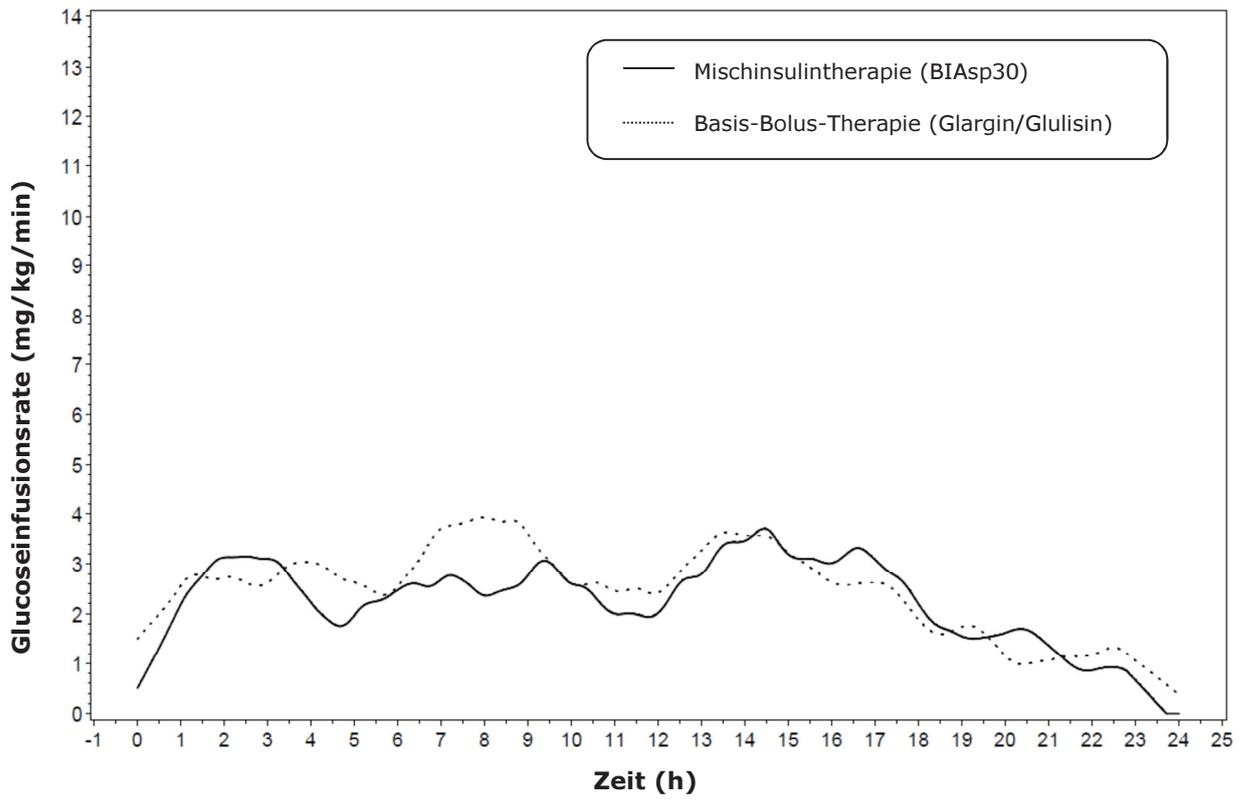
Patient 015



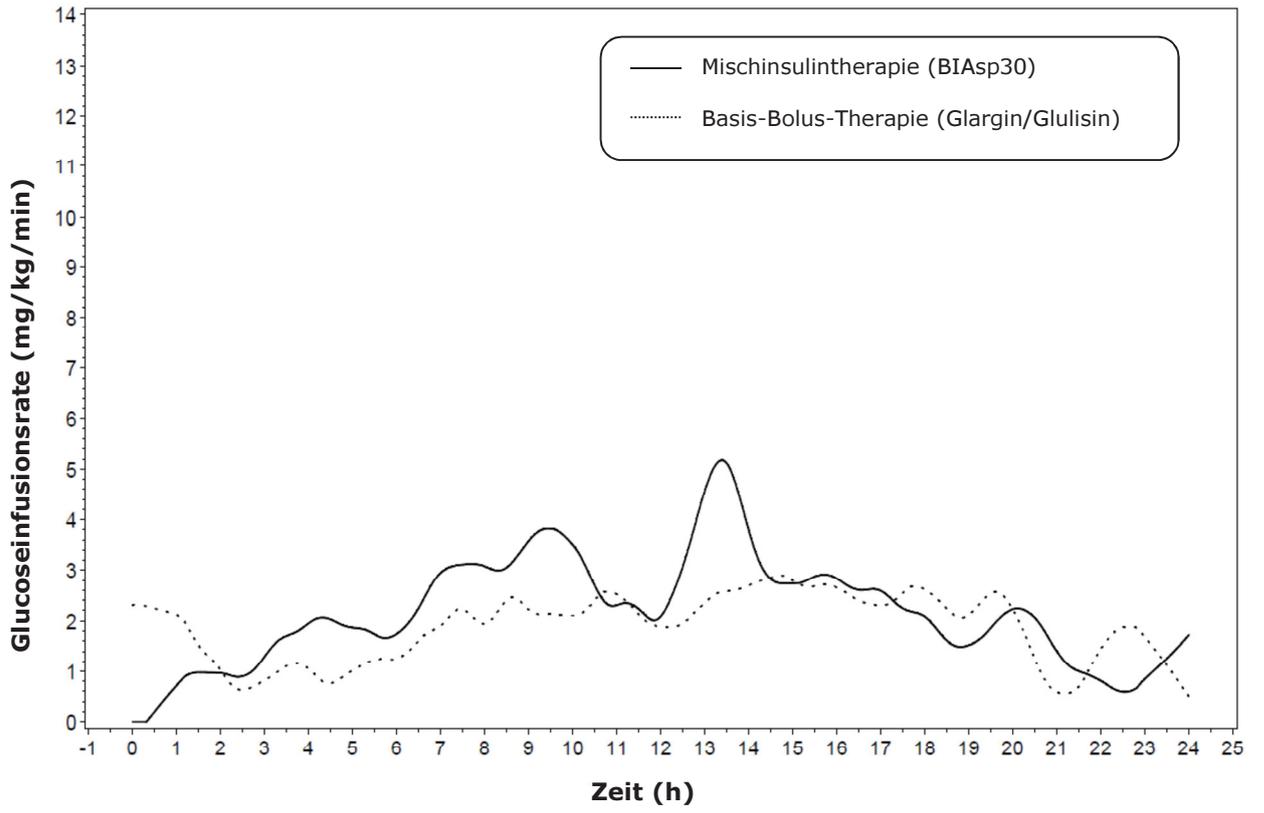
Patient 017



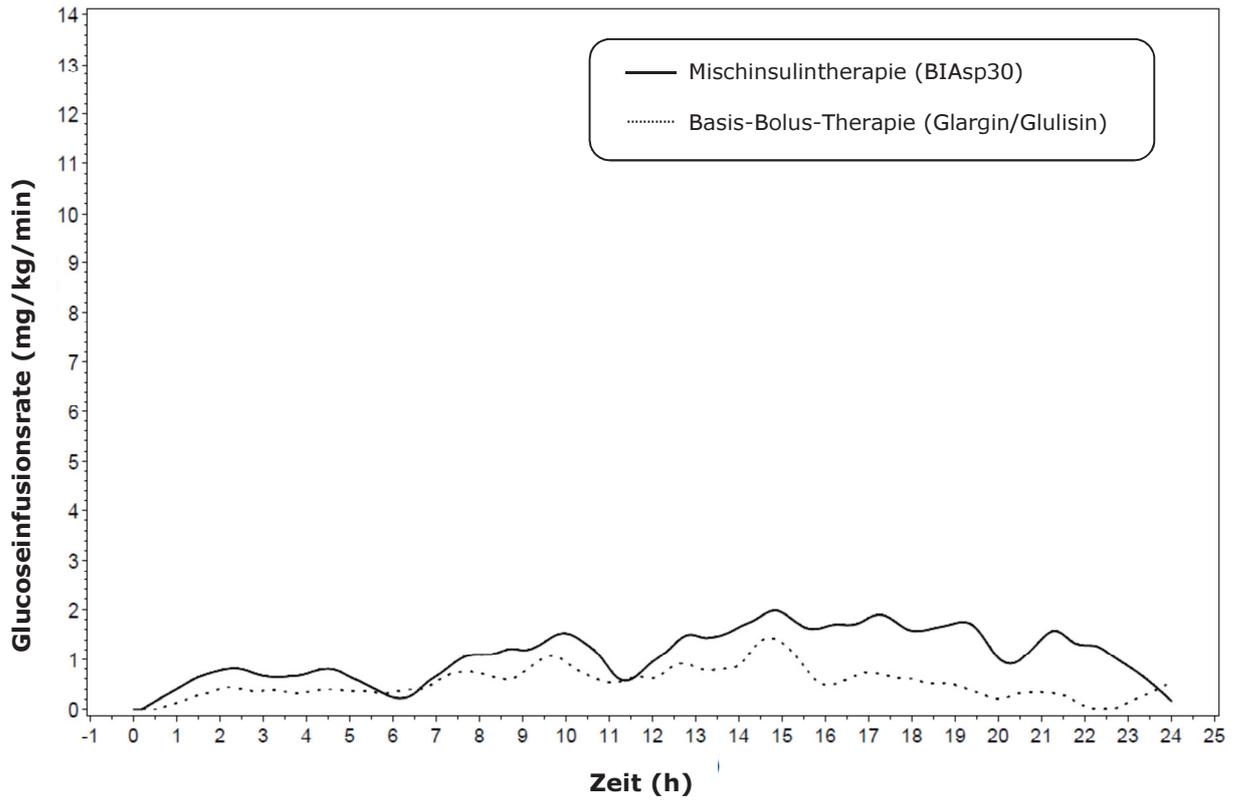
Patient 020



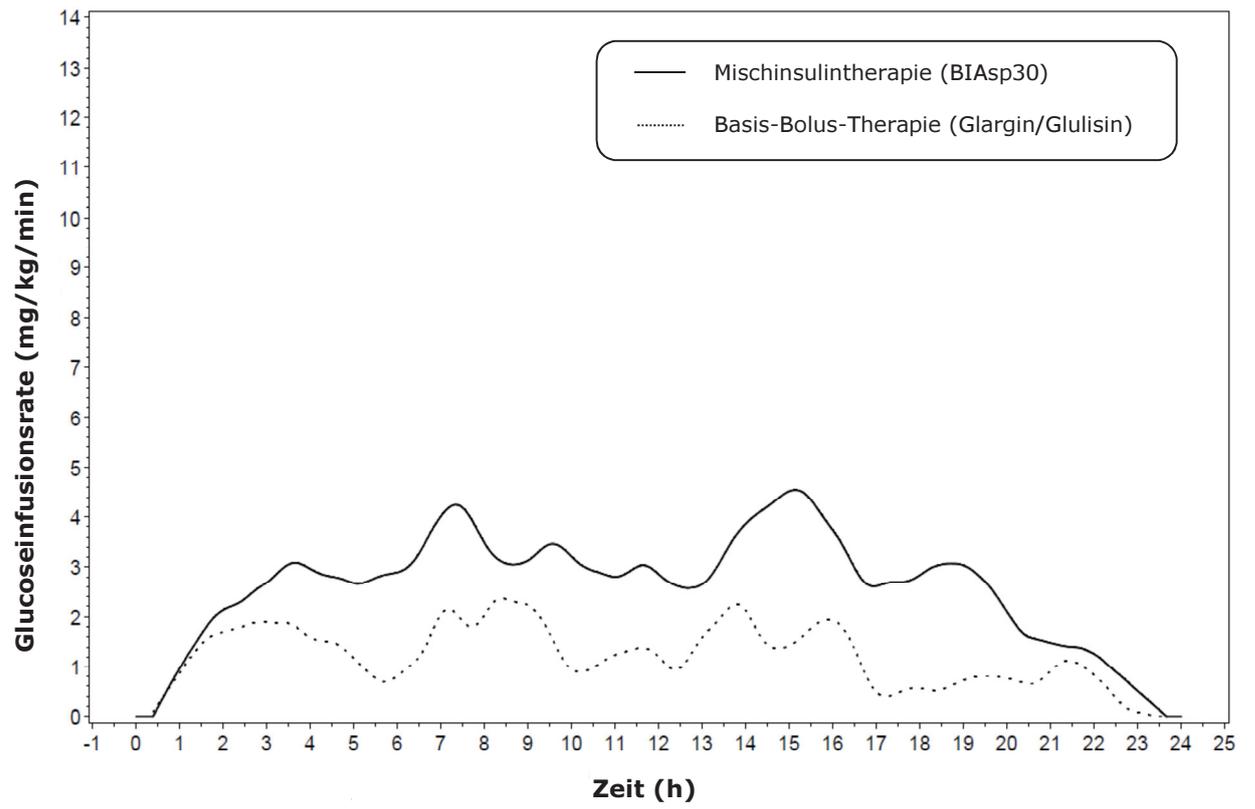
Patient 021



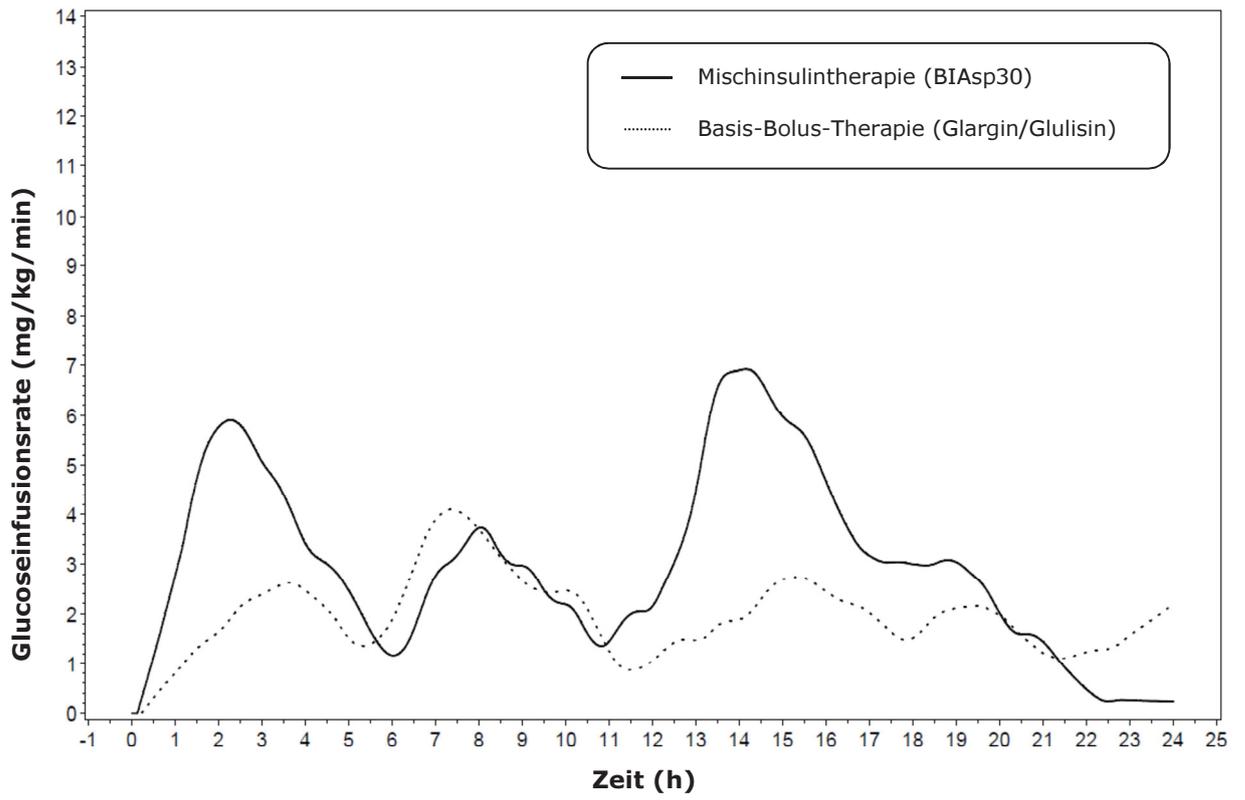
Patient 023



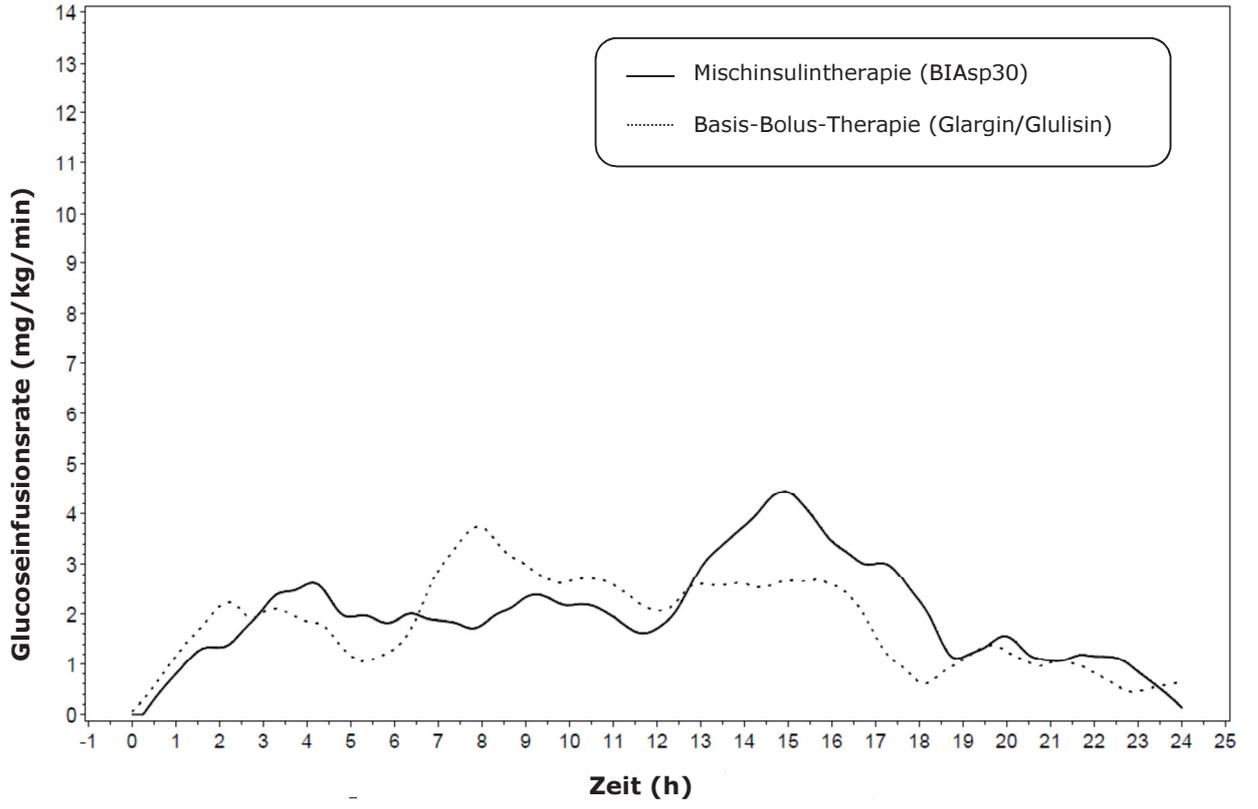
Patient 024



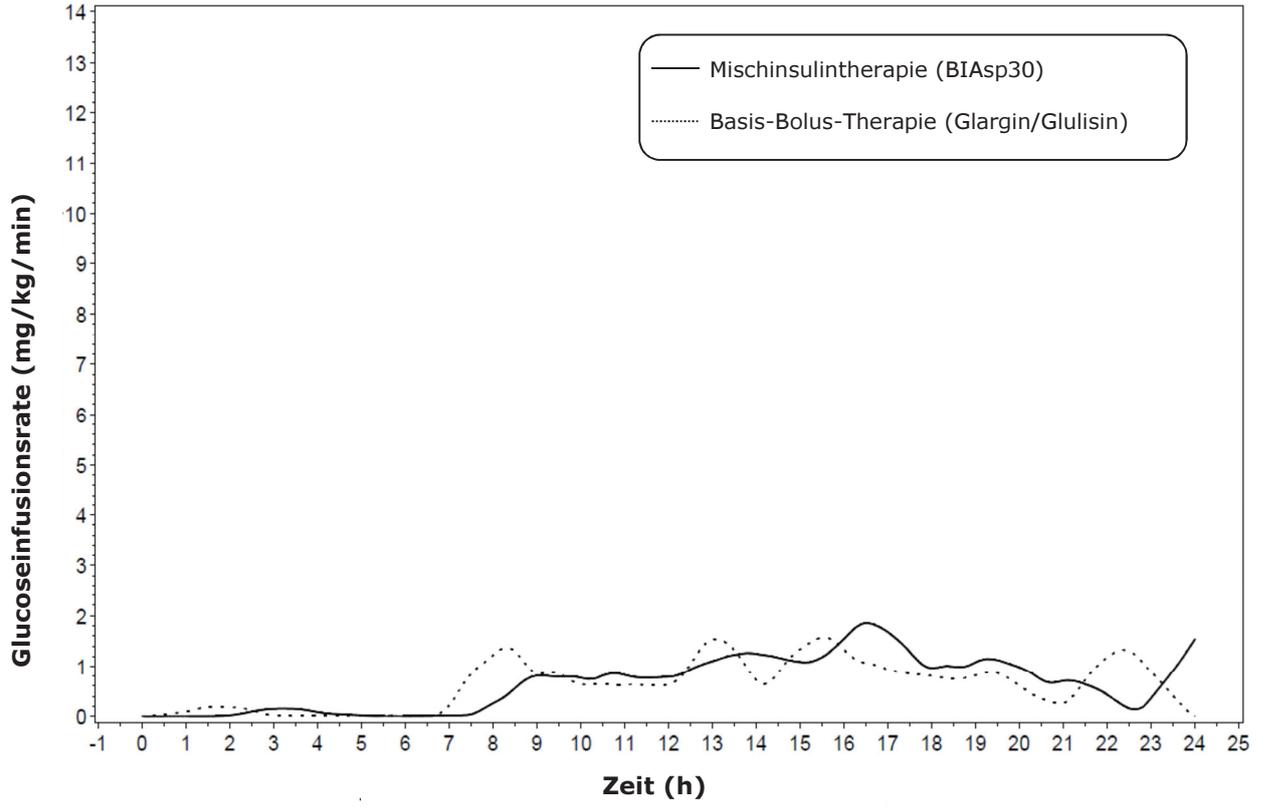
Patient 028



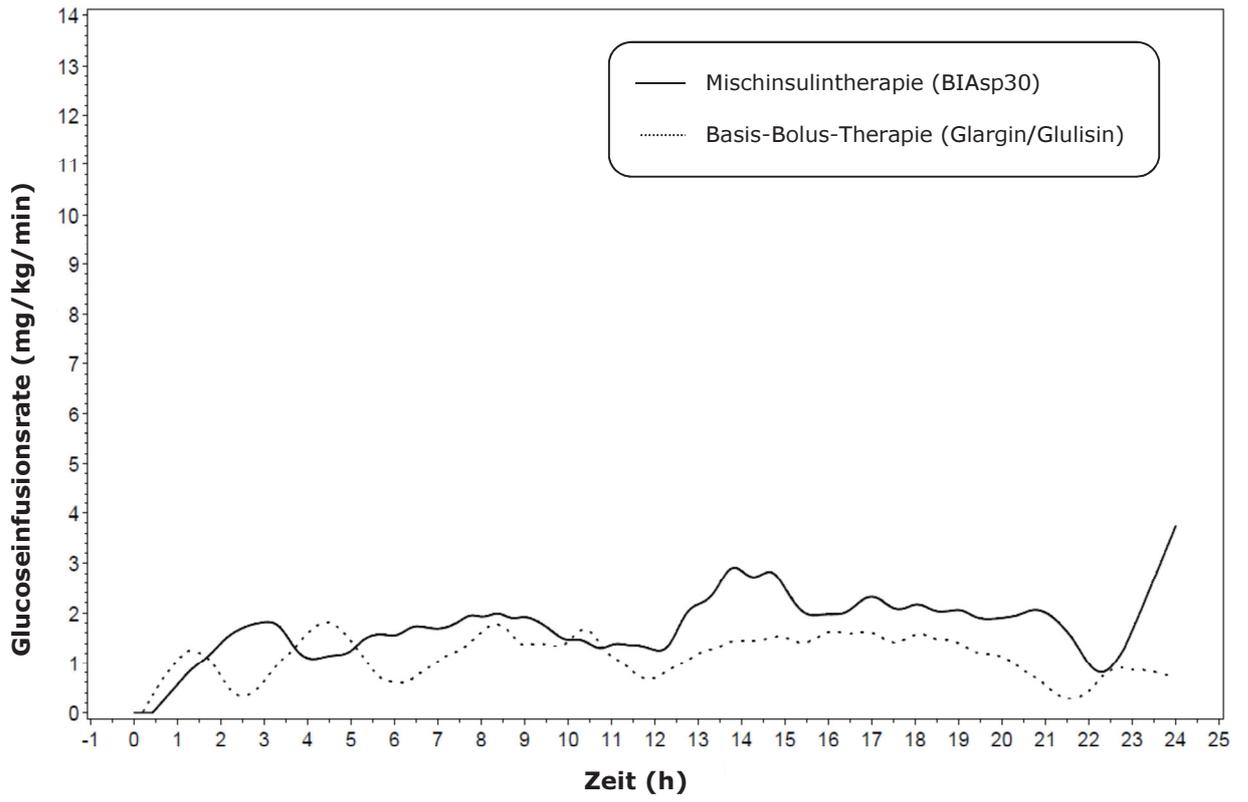
Patient 029



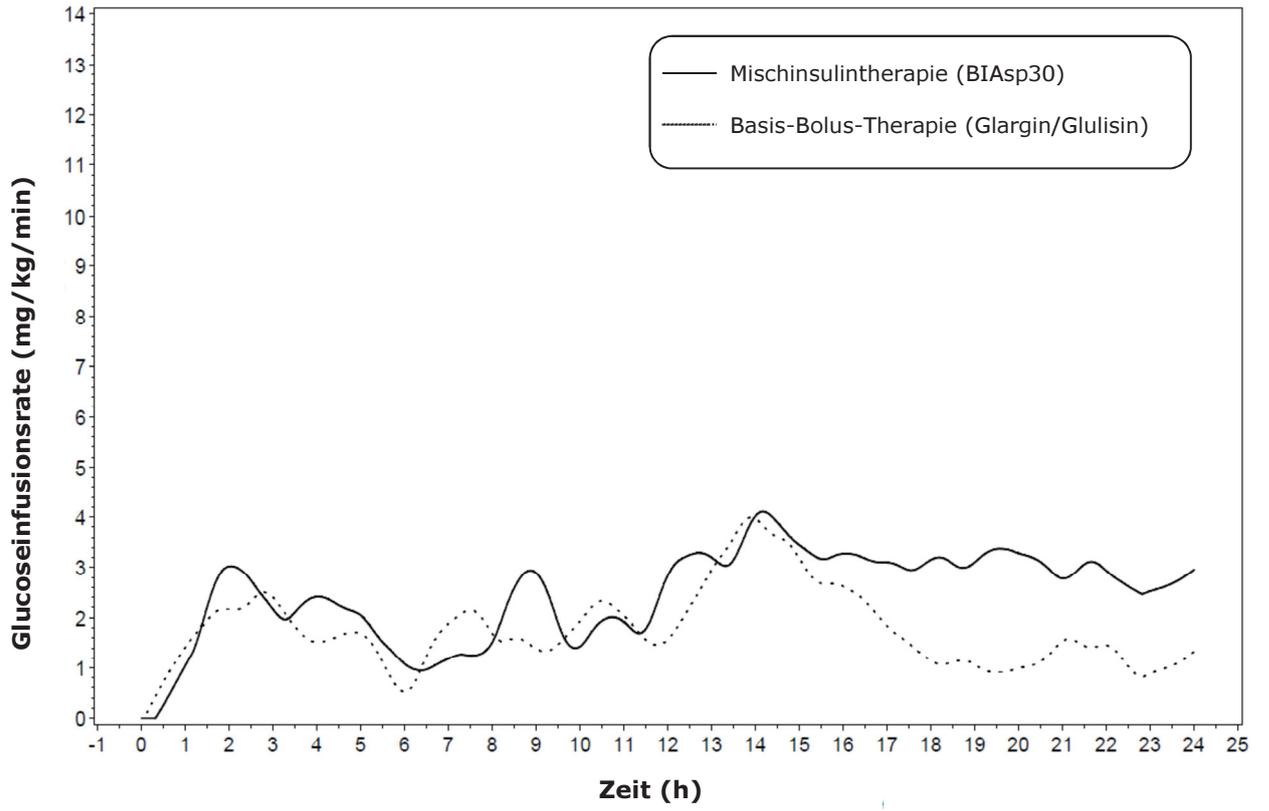
Patient 030



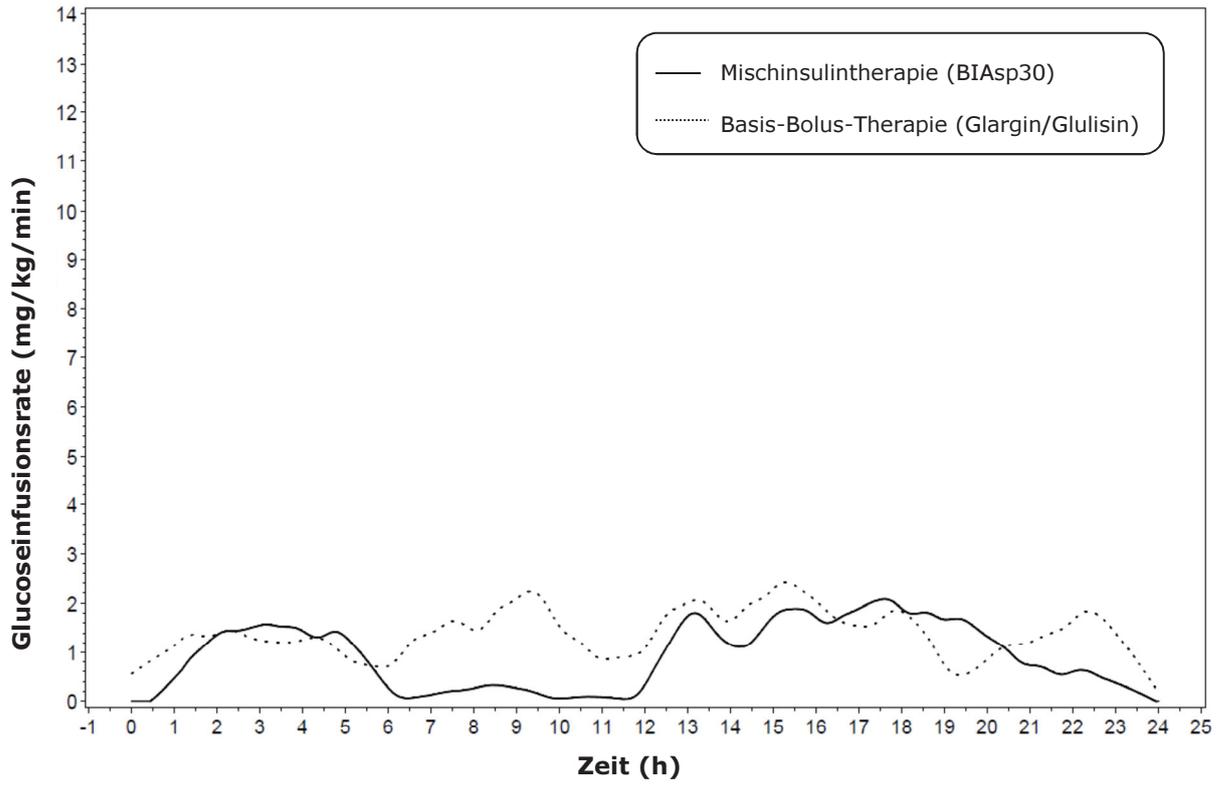
Patient 032



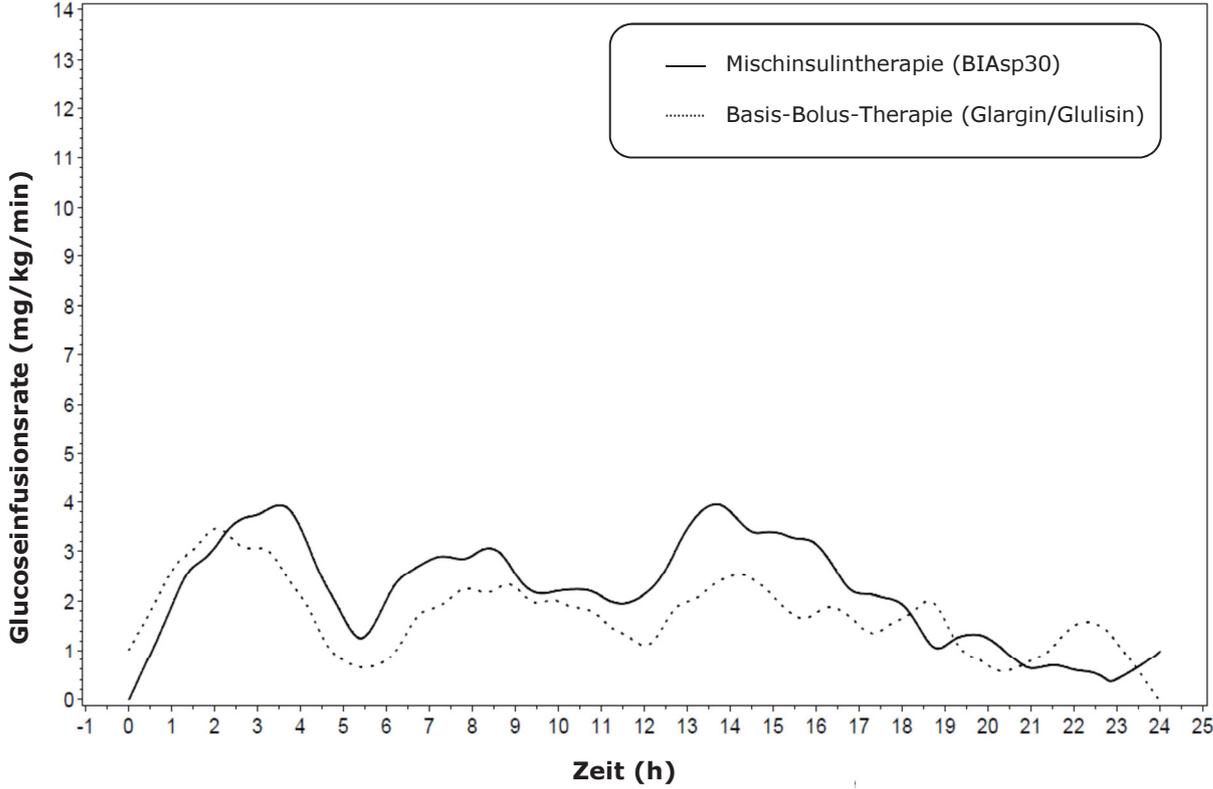
Patient 033



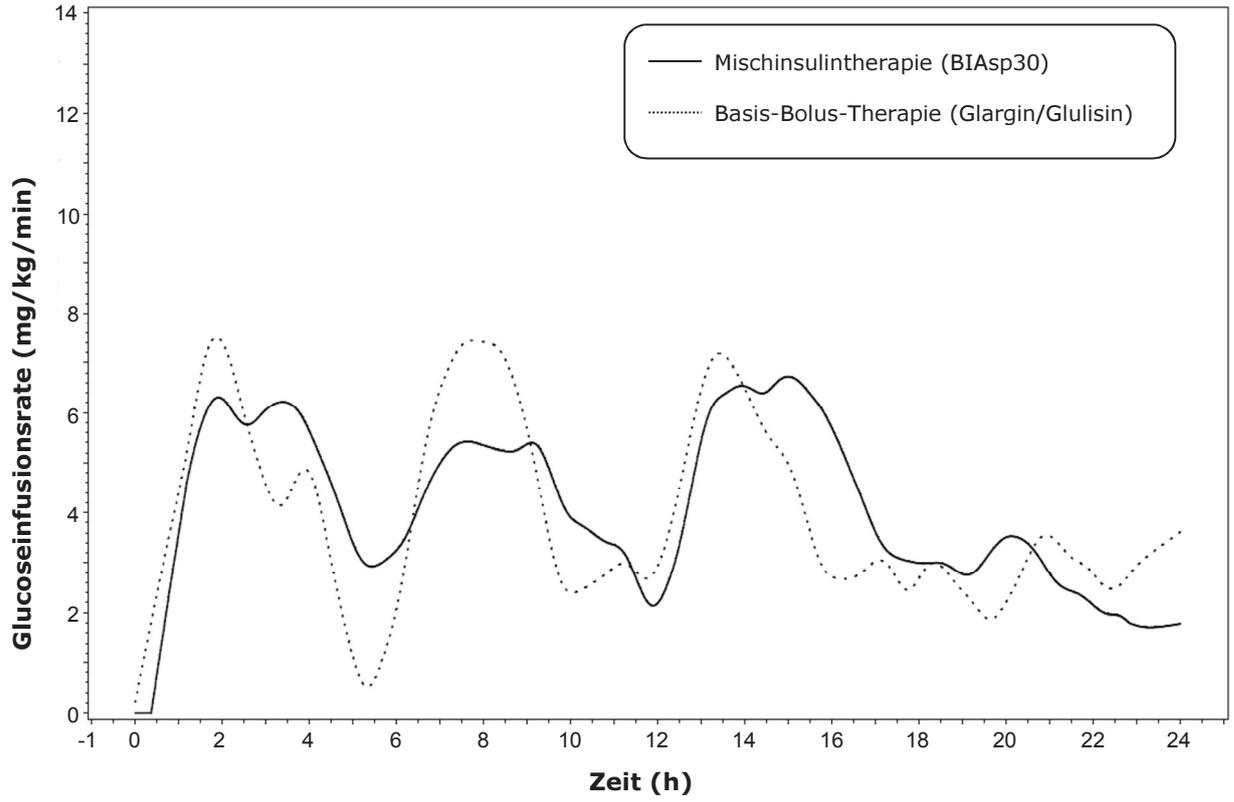
Patient 034



Patient 035



Patient 036



Anhang 2: Beispiel eines C-Peptidprofils während der Clampversuche

Patient 005

