

---

UNIVERSITE DE LAUSANNE - FACULTE DE BIOLOGIE ET DE  
MEDECINE

DEPARTEMENT DE MEDECINE

Service de gastro-entérologie et hépatologie

Chef de service : Professeur Pierre Michetti

---

**Vergleich von oraler und parenteraler  
Verabreichung von Glucagon-like Peptide-1  
Pilotprojekt**

THESE

préparée sous la direction du Professeur associé Gian Dorta  
et avec la collaboration du Professeur Christoph Beglinger,  
chef du Service de gastro-entérologie de l'Hôpital Universitaire de  
Bâle,

et présentée à la Faculté de biologie et de médecine de  
l'Université de Lausanne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN MEDECINE

par

WK  
170  
GAN

Cornelia GANZONI

BKTE 3546

Médecin diplômée de la Confédération Suisse

Originaire de Celerina/Schlarigna

Lausanne

2007

1

Bibliothèque Universitaire  
de Médecine / BiUM  
CHUV-BH08 - Bugnon 46  
CH-1011 Lausanne

# Comparaison de l'administration orale et parentérale de Glucagon-like Peptide 1 : Projet pilote

## Résumé

Le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) est synthétisé par les cellules L du tractus gastro-intestinal et est sécrété dans le sang lors du repas. Grâce à ses fonctions d'hormone de satiété et d'incrétine, il joue un rôle important dans le système complexe de l'homéostasie énergétique. Dans ce contexte, cette molécule est intéressante dans la thérapie du diabète sucré de type 2 et de l'obésité. Comme tous les peptides, le GLP-1 est rapidement dégradé par l'acidité gastrique et les enzymes digestifs lors de son administration orale ; c'est pourquoi il est administré uniquement par voie intra-veineuse ou sous-cutanée.

Le but de cette étude était d'analyser l'absorption intestinale du GLP-1 administré simultanément avec une molécule de type «promoteur de l'absorption». C'était une étude phase 1, ouverte, placebo-contrôlée, avec un «cross-over» à 5 bras à des doses croissantes. Le promoteur de l'absorption était une molécule appelée SNAC (sodium N-(8-(2-hydroxybenzoyl)amino) caprylate) qui protège les peptides de la dégradation intestinale et améliore leur absorption.

Les valeurs de GLP-1, d'insuline et de glucose mesurées dans les prises de sang ont montré clairement que le peptide a pu être absorbé grâce à la molécule SNAC et a de ce fait stimulé la sécrétion d'insuline. Lors du deuxième dosage, cette sécrétion d'insuline avait déjà atteint un niveau maximal qui n'augmentait plus, même avec des dosages plus élevés.

Les concentrations de GLP-1 ont atteint des valeurs pharmacologiques et ont augmenté en fonction de la dose (pour la AUC et pour Cmax). En comparaison avec l'administration veineuse de GLP-1, l'administration orale a démontré une biodisponibilité calculée de 4% en moyenne.

L'étude montre que le GLP-1 peut être administré par voie orale grâce à des promoteurs de l'absorption. Dès lors, des études thérapeutiques avec le GLP-1 administré oralement peuvent être entreprises.

## Zusammenfassung

Das Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) wird von den L-Zellen des Magendarmtrakts gebildet und während der Nahrungsaufnahme ins Blut sezerniert. Seine Funktionen als Sättigungshormon und Inkretin machen es zu einem wichtigen Element im komplexen System der Energiehomöostase, und es stellt daher ein interessantes Molekül für potenzielle Therapiemöglichkeiten von Diabetes Mellitus Typ 2 und Übergewicht dar. Wie alle Peptide wird es jedoch – bei oraler Verabreichung – schnell durch die Magensäure und die Verdauungsenzyme zersetzt, weshalb es bisher nur intravenös oder subkutan appliziert werden konnte.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der enteralen Absorption von GLP-1, welches gemeinsam mit einem so genannten Carriermolekül verabreicht wurde. Sie wurde als eine Phase 1, open-label, placebo-kontrollierte, fünf-Arm cross-over-Studie mit aufsteigenden Dosierungen durchgeführt. Beim Carriermolekül handelt es sich um SNAC (sodium N-(8-(2-hydroxybenzoyl)amino) caprylate), welches Peptide vor der Verdauung schützt und somit absorbierbar macht.

Die aus den Blutentnahmen ermittelten GLP-1-Werte und Insulinwerte, sowie die gemessenen Glukosespiegel zeigen deutlich, dass das Peptid mit Hilfe des Carriermoleküls SNAC absorbiert wird und die Insulinausschüttung stimuliert. Letztere erreichte im Versuch schon nach der zweiten Dosierung ein konstantes Niveau und konnte danach auch mit höheren Dosierungen nicht mehr weiter gesteigert werden. Die GLP-1-Konzentrationen erreichten pharmakologische Werte, wobei ein dosis-abhängiger Anstieg dokumentiert werden konnte (sowohl für AUC als auch für C<sub>max</sub>). Durch die intravenöse GLP-1-Verabreichung kann eine orale Biodisponibilität von im Schnitt 4% errechnet werden.

Die Studie zeigt auf, dass das GLP-1 dank Carriermolekülen oral verabreicht werden kann und daher für weitere Untersuchungen möglicher Therapieanwendungen in Frage kommt.

## **Danksagung**

Es ist mir ein aufrichtiges Anliegen, jenen Personen meine Dankbarkeit auszudrücken, welche mich im Rahmen der Erarbeitung meiner Dissertation grosszügig unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich Herrn Dr. med. Gian Dorta aus Lausanne für seine Unterstützung in administrativen Fragen sowie für seine Hilfe bei der Bewältigung der sprachlichen Herausforderungen und bei den Übersetzungen ausdrücken.

Im Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Christoph Beglinger aus Basel dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit geboten hat, an einer ausserordentlich interessanten, lehrreichen und spannenden Studie teilnehmen zu dürfen. Seine umfangreiche Unterstützung und seine permanente Bereitschaft, für meine Anliegen und Fragen zu Verfügung zu stehen, waren für mich ausserordentlich hilfreich.

Einen weiteren grossen Dank ausdrücken möchte ich Frau Luisa Baselgia und dem ganzen Team des Clinical Research Center am Universitätsspital Basel für die Organisation der praktischen Durchführung der Studie und für die grosse Hilfe, die sie mir haben zukommen lassen.

Cornelia Ganzoni, Lausanne im August 2007

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....   | <b>6</b>  |
| 1.1    Allgemeine Einleitung.....  | <b>6</b>  |
| 1.2    Sättigungshormone und Appetitregulation.....  | <b>7</b>  |
| 1.3    Glucagon-like peptide 1.....  | <b>7</b>  |
| 1.4    Enterale Absorption und Carrier-Moleküle.....   | <b>9</b>  |
| <b>2. Zielsetzung der Arbeit</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>3. Methodik</b> .....   | <b>11</b> |
| 3.1    Versuchspersonen.....   | <b>11</b> |
| 3.2    Versuchsablauf.....   | <b>11</b> |
| 3.3    Material.....   | <b>13</b> |
| 3.3.1    GLP-1-Applikation.....  | <b>13</b> |
| 3.3.2    Blutentnahmen und Behandlung der Blutproben.....  | <b>13</b> |
| 3.4    Bestimmungen .....  | <b>14</b> |
| 3.4.1    Glukosebestimmung .....   | <b>14</b> |
| 3.4.2    Insulinbestimmung .....   | <b>14</b> |
| 3.4.3    GLP-1-Bestimmung.....   | <b>15</b> |
| <b>4. Statistik</b> .....  | <b>16</b> |
| 4.1    Pharmakokinetik.....  | <b>16</b> |
| 4.2    Statistische Analyse .....  | <b>16</b> |
| <b>5. Ergebnisse</b> .....   | <b>17</b> |
| 5.1    Plasmakonzentrationen von GLP-1 .....   | <b>17</b> |
| 5.2    GLP-1-Plasmakonzentrationen nach intravenöser Verabreichung .....   | <b>18</b> |
| 5.3    Verhältnis der Dosierung zu den AUC-Medianwerten (0-360').....  | <b>19</b> |
| 5.4    Verhältnis der Dosierung zu den AUC-Mittelwerten (0-360') .....   | <b>20</b> |
| 5.5    Verhältnis der Dosierung zu den Medianwerten der maximalen<br>GLP-1-Plasmakonzentrationen (Cmax-Median).....      | <b>21</b> |
| 5.6    Verhältnis der Dosierung zu den Mittelwerten der maximalen<br>GLP-1-Plasmakonzentrationen (Cmax-Mittelwert) ..... | <b>22</b> |
| 5.7    Zeitpunkte der maximalen GLP-1-Plasmakonzentrationen (Tmax) .....   | <b>23</b> |
| 5.8    Insulin-Plasmakonzentrationen nach oraler GLP-1-Verabreichung.....  | <b>24</b> |
| <b>6. Diskussion</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>8. Anhang</b> .....   | <b>29</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einleitung

Wie können wir Größe und Zusammensetzung von Mahlzeiten täglich und auch von einer Mahlzeit zur anderen variieren und trotz diesen kurzfristigen Änderungen in der Energiebilanz, die Energieaufnahme und den Energieverbrauch relativ präzise und über eine längere Periode hinweg konstant halten?

Das Phänomen, das uns eine Konstanzhaltung des Körpergewichtes ermöglicht, heisst Energiehomöostase und bezeichnet ein Regulationssystem, das langfristig darauf ausgerichtet ist, eine ausgeglichene Energiebilanz herzustellen. Unser Essverhalten wird durch physiologische, metabolische und zentrale Regulationsmechanismen gesteuert, welche Hunger- und Sättigungszustände verursachen und so Appetit und Nahrungsaufnahme regulieren.

Zentraler Regulator ist dabei der Hypothalamus. Hier werden die verschiedenen „Inputs“ (neurale, metabolische und endokrine Signale) von der Peripherie und dem ZNS (sensorische Faktoren wie der Anblick und das Aussehen einer Speise) miteinander „verrechnet“. Die resultierenden Informationen („Outputs“) werden schliesslich an diverse ZNS-Regionen und an die Peripherie weitergegeben.

Zur Steuerung der Nahrungsaufnahme gibt es einerseits kurzfristige Kontrollmechanismen („satiety signals“), wie z.B. Magendehnung, Nährstoffsignale aus dem Darm und zirkulierende Sättigungshormone, die vor allem ein Gefühl von Sättigung hervorrufen und so die Grösse einer einzelnen Mahlzeit begrenzen; andererseits beeinflussen langfristige Sättigungssignale („adiposity signals“), wie Leptin und Insulin, als Langzeitregulatoren die Fettreserven, die Energie-Homöostase und die Erhaltung des Körpergewichtes. Für die Regulation von Sättigkeit benötigt der Hypothalamus vor allem Informationen über die Höhe des Energiespeichers, also des Körperfettanteils. Die „Adiposity Signals“ gelangen über die Zirkulation und die Blut-/Hirnschranke in den Hypothalamus, wo ein Zusammenspiel mit zentralnervösen anabolen (orexigenen) Effektorhormonen wie z.B. Neuropeptid Y, bzw. katabolen (anorexigenen) Neuropeptiden wie z.B.  $\alpha$ -MSH, erfolgt.

## 1.2 Sättigungshormone und Appetitregulation

Neben kephalen und oralen Kontrollmechanismen spielt der Gastrointestinaltrakt eine wichtige Rolle bei der Nahrungsaufnahme und Appetitregulation. Ein vernetztes System von verschiedenen Kontrollmechanismen stellt den Erhalt eines stabilen Körpergewichts sicher. Dies obwohl wir uns täglich unterschiedlich grosse Mengen an Kalorien zuführen. Ein Kontrollorgan im Gehirn und ein Detektor im Magendarmtrakt mit verschiedenen Rückkopplungsmechanismen werden durch ein hormonelles und neurales Signalsystem vernetzt, wodurch die Nahrungsaufnahme und der Energieverbrauch reguliert werden.<sup>1</sup>

Der Magendarmtrakt sezerniert während einer Mahlzeit laufend verschiedene Hormone, welche das Gehirn über Menge und Art der aufgenommenen Nahrung informieren, und welche als so genanntes negatives Feedback hemmend auf höher gelegene Darmabschnitte wirken. Diese Hormone sind unter anderem Cholezystokinin, Gastrin releasing Peptide, Neuromedin B, Amylin, Oxyntomodulin, Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) usw. Sie wirken einerseits indem sie spezifische Rezeptoren binden, welche auf Fasern des Vagusnervs liegen, andererseits indem sie – ins Blut sezerniert – die Bluthirnschranke passieren.<sup>1-3</sup> Letzteres gilt auch für das GLP-1. Der Vagusnerv leitet das Signal ans Gehirn, speziell den Nucleus arcuatus im Hypothalamus und auch an den Nucleus tractus solitarius weiter.

## 1.3 Glucagon-like Peptide 1

Glucagon-like peptide (GLP-1) ist ein Peptid aus der Glucagonfamilie, welches in den L-Zellen des distalen Ileums und Colons durch posttranslationelle Spaltung von Proglukagon gebildet wird.<sup>4</sup>

Diese Aminosäurenkette wird als GLP-1(7-37) oder GLP-1(7-36) sezerniert und im Blut innerhalb von ca. 2 Minuten durch das Enzym Dipeptidylpeptidase IV zu inaktivem GLP-1(9-37) und GLP-1(9-36) abgebaut.<sup>5</sup> GLP-1 wirkt auf spezifische Rezeptoren (GLP-1-Rezeptoren); diese können im gesamten Gastrointestinaltrakt, im Pankreas, im Herz, in den Nieren und Lungen sowie im ZNS nachgewiesen werden.<sup>19</sup> Die Sekretion erfolgt primär auf Nahrungssubstrate, wobei vor allem Kohlenhydrate und Fette die GLP-1 Sekretion stimulieren; neurale und humorale Mechanismen aus höheren Darmabschnitten vermitteln einen Teil der Stimulation. Zu den Wirkungen von GLP-1 gehören die Potenzierung der Insulinsekretion (Inkretineffekt), die Insulinsensibilisierung der peripheren Zellen, die Hemmung der gastrointestinalen Motilität und

der gastrointestinalen Sekretionen, sowie die Verzögerung der Magenentleerung.<sup>6,7</sup> Die Wirkung auf die Insulinsekretion zeichnet GLP-1 als wichtiges Inkretin aus.

Ein weiterer, interessanter Effekt stellt das Sättigungssignal ans Gehirn dar. Exogen verabreichtes GLP-1 kann die Nahrungsaufnahme vermindern und den Appetit reduzieren. Der Wirkungsmechanismus ist nicht klar: im Magendarmtrakt könnte die Hemmung der Magenentleerung ein Faktor darstellen. Daneben wurden auch zentrale Mechanismen diskutiert. So wurden im Hirnstamm GLP-1-sezernierende Zellen gefunden, welche Signale in die im Hypothalamus und Hirnstamm gelegenen Areale senden, welche wiederum für die Energiehomöostase wichtig sind.

Das im Magendarmtrakt synthetisierte GLP-1 kann die Bluthirnschranke passieren; ob dabei ein Sättigungsgefühl ausgelöst wird ist unklar, aber die Beobachtung bildet die Grundlage für einen potentiellen Wirkungsmechanismus. Dieser Effekt wurde in mehreren Studien, in verschiedenen Versuchsgruppen durch peripher verabreichtes GLP-1 nachgewiesen.<sup>8-11</sup> Die GLP-1-induzierte Verminderung der Nahrungsaufnahme erfolgt zentral wahrscheinlich durch zwei verschiedene Mechanismen: zum einen kann das Peptid über GLP-1-Rezeptoren im Hypothalamus wirken, welche Teil der normalen Energiehomöostase sind,<sup>12-15</sup> zum anderen über GLP-1-Rezeptoren in der Amygdala, welche nach Bindung dieses Hormons Symptome wie Schwindel und Übelkeit hervorrufen können.<sup>12,16-18</sup> Eine zusätzliche Rolle spielt GLP-1 in der Regulierung des Salz- und Wasserhaushalts, indem es die Natriumausscheidung steigert und zu einer Alkalisierung des Urins führt.<sup>20</sup>

Die Tatsache, dass GLP-1 eine wichtige Funktion sowohl für die Glukosehomöostase als auch für die Regulierung der Nahrungsaufnahme wahrnimmt, bildet die Grundlage für potentielle therapeutische Anwendungen: das Peptid könnte als Therapie des Typ II Diabetes verwendet werden (verbesserte Insulinsekretion und Insulinsensitivität) sowie als Mittel für die Behandlung von Übergewicht mit all seinen negativen Begleiterscheinungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 2. Dabei bereiten jedoch die Notwendigkeit einer Infusion und seine kurze Halbwertszeit Probleme. Die kurze Halbwertszeit resultiert aus der Degradation durch DPP-IV sowie durch die Extraktion des GLP-1 aus dem Blut bei der ersten Leberpassage. Aus diesem Grund ist auch die GLP-1-Konzentration im splanchnischen Blut höher als im systemischen Kreislauf, was weiter erklärt, weshalb das Peptid nach seiner Freisetzung durch Nahrungsaufnahme vor allem eine lokale Wirkung, z.B. auf die endokrine Pankreasfunktion hat. Eine orale Biodisponibilität galt bis vor kurzem als unmöglich, sind doch Peptide im Magen und Duodenum einer raschen Degradation ausgesetzt.

## 1.4 Enterale Absorption und Carrier-Moleküle

Der Gastrointestinaltrakt ist eine schwierige Umgebung für Peptide. Magensäure und eine Batterie von Peptidasen sorgen dafür, dass Peptide degradiert und in Aminosäuren abgebaut werden. Peptide werden also schnell durch Verdauungsenzyme zersetzt, wobei die proteolytische Aktivität vor allem im Magen und im Duodenum am Höchsten ist.<sup>22</sup>

Damit ein Peptid-Molekül vom Gastrointestinaltrakt absorbiert werden kann, muss es bestimmte physikalische und chemische Eigenschaften aufweisen, wie zum Beispiel ein tiefes Molekulargewicht (unter 500-1000 Dalton), angemessene pKa, Lipophilie (log D) und eine gute Löslichkeit.<sup>21</sup> Neuere Untersuchungen haben nun ergeben, dass durch verschiedene Massnahmen die Peptide vor einer Degradation geschützt werden können.

SNAC (sodium N-(8-(2-hydroxybenzoyl)amino) caprylate) ist ein kleines, organisches und hydrophobes Molekül, ein so genanntes Carrier-Molekül<sup>23</sup>, welches eine nicht-kovalente, reversible Bindung mit Makromolekülen, wie Peptiden, eingeht, und so die orale Absorption ermöglicht. Durch diese Bindung erhöht das SNAC die Lipophilie des Zielmoleküls (z.B. des GLP-1), indem es seine Tertiärstruktur reversibel verändert, wodurch lipophile Reste an die Peptidoberfläche gebracht werden. Nach Aufnahme und Verdünnung im Blut lösen sich das GLP-1 und das SNAC wieder voneinander, wobei das GLP-1 wieder seine ursprüngliche, biologisch aktive Tertiärstruktur einnimmt.<sup>21,24-26</sup>

Mit Hilfe von solchen Carrier-Molekülen wurden schon andere Makromoleküle wie Insulin, Heparin und Calcitonin mit Erfolg oral verabreicht.<sup>21,23,25-27</sup>

## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Hypothese: Durch Verwendung des Moleküls SNAC (sodium N-(8-(2-hydroxybenzoyl) amino) caprylate) übersteht das GLP-1 die Magen- und Duodenum-passage und kann als intaktes und aktives GLP-1 aus dem Dünndarm resorbiert werden.

Das Ziel der Studie war es deshalb zu untersuchen, ob GLP-1 durch Verwendung von SNAC absorbiert und ein dosisabhängiges pharmakologisches Profil erstellt werden kann; wir waren zusätzlich interessiert zu prüfen, ob resorbiertes GLP-1 seine insulinfreisetzende Wirkung nach oraler Verabreichung beibehalten kann.

Bei der Studie handelt es sich um eine Phase 1, open-label, placebo-kontrollierte, fünf-Arm cross-over-Studie mit aufsteigenden Dosierungen.

### **3. Methodik**

#### **3.1 Versuchspersonen**

Für die Studie wurden sechs männliche Probanden mit einem Durchschnittsalter von  $24 \pm 2$  Jahren rekrutiert. Als Einschlusskriterien galten:

1. Gewicht im Abweichungsbereich von 15% des Idealgewichts
2. Alter zwischen 18 und 45 Jahren
3. Nichtraucher
4. Keine aktuellen medizinischen Probleme
5. Keine Medikamenteneinnahme
6. Keine Allergien (inkl. Lebensmittelallergien)
7. Keine früheren, gastrointestinalen Beschwerden oder Gewichtsprobleme

Nachdem die Versuchspersonen schriftlich über die Studie, deren mögliche Risiken sowie über die jederzeitige Ausstiegsmöglichkeit aufgeklärt wurden, gaben sie ihr schriftliches Einverständnis. Anschliessend wurden sie zu den Einschlusskriterien befragt, welche alle erfüllten. Im Anschluss wurden Grösse, Gewicht, BMI, Blutdruck, Puls, die persönlichen Daten und die Rasse notiert. Jeder der sechs Probanden gab an, normale Essgewohnheiten einzuhalten. Das Protokoll der Studie wurde dem „Ethischen Komitee beider Basel“ vorgelegt und wurde von diesem genehmigt.

#### **3.2 Versuchsablauf**

Für die Studie waren pro Proband sieben Versuchstage vorgesehen. An den ersten sechs Tagen sollte das GLP-1 oral und mit jeweils aufsteigenden Dosierungen (0mg, 0,5mg, 1mg, 2mg, 4mg und 8mg/100mg SNAC) verabreicht werden, während am letzten Tag eine intravenöse Applikation mit einer Infusionslösung (0.4 pmol/kg pro Minute) geplant war. Dass am ersten Tag eine Plazebokapsel, also 0mg GLP-1 enthaltend, verabreicht wurde, war den Probanden bekannt gegeben worden.

Von den sechs Versuchstagen mit oraler Verabreichung konnten nur deren fünf durchgeführt werden, da zwei der sechs Probanden bei der zweitletzten Dosierung von 4mg GLP-1/100mg SNAC Übelkeit empfanden, worauf auf eine weitere höhere Dosierung verzichtet wurde.

Zwischen den einzelnen Versuchstagen lagen jeweils mindestens drei versuchsfreie Tage.

Die Versuchspersonen durften am Vorabend ab 22 Uhr nichts mehr essen und ausser Wasser auch nichts trinken. Am Morgen durften sie, bis zwei Stunden nach der Tabletteneinnahme, auch kein Wasser mehr zu sich nehmen. Nach diesen zwei Stunden durften sie Wasser nach Belieben trinken. Sobald sie morgens um 7.30 Uhr in nüchternem Zustand im Clinical Research Center am Universitätsspital Basel eintrafen, wurden ihnen Venenverweilkatheter zur Blutabnahme gesetzt.

Zwei Blutentnahmen wurden vor der GLP-1-Einnahme vorgenommen, und die Restlichen während den darauf folgenden 6 Stunden. Für die Tage mit oraler GLP-1-Verabreichung erfolgten die Blutentnahmen zu den Zeitpunkten: -15', -1', + 15', + 30', + 45', + 60', + 90', + 120', + 150', + 180', + 240', + 300', + 360'. Bei den 8 Zeitintervallen; -15', -1', + 30', + 60', + 120', + 180', + 240', + 360' wurde mit Hilfe einer Tuberkulinspritze aus jeweils etwa 0.1ml Blut, mittels Glukoseteststreifen, der Blutglukosespiegel bestimmt.

Am Tag der intravenösen Applikation wurde grundsätzlich gleich vorgegangen. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen waren: -15', -1', + 15', + 30', + 45', + 55', + 65', + 75', + 90', + 105', + 120', + 150', + 180' und 360'. Der Blutglukosespiegel wurde zu den Zeitpunkten -15', -1', 45', 65', 120', 180' und 360' gemessen.

Das entnommene Blut wurde in Monovetten abgefüllt und zentrifugiert. Aus dem erhaltenen Plasma, welches zur Lagerung auf -20°C gefroren wurde, wurden später durch das Labor des Departements Forschung des Universitätsspitals Basel die GLP-1-Werte sowie die Insulinkonzentrationen bestimmt.

Die detaillierte Beschreibung des Versuchsablaufs ist dem Anhang zu entnehmen.

### **3.3 Material**

#### **3.3.1 GLP-1 Applikation**

Die Tabletten wurden von Birk Poller, Pharmazeut im Departement für klinische Pharmakologie, hergestellt. Die GLP-1-Tabletten bestanden aus SNAC (sodium N-(8-(2-hydroxybenzoyl)amino)caprylate) und GLP-1, welches in jeweils folgenden Konzentrationen enthalten war:

- 0,5 mg/100mg SNAC
- 1,0 mg/100mg SNAC
- 2,0 mg/100mg SNAC
- 4,0 mg/100mg SNAC

Die Substanz SNAC und GLP-1 wurden von der Firma "Emisphere Technologies", Tarrytown, New York, USA zur Verfügung gestellt.

Die GLP-1-Lösung am Versuchstag der intravenösen Applikation bestand aus 0,9% NaCl und 0,1% HSA. Die Dosierung der Infusionslösung ergab für jeden Probanden 0.4 pmol/kg pro Minute. Die Infusion wurde während 45 min verabreicht.

#### **3.3.2 Blutentnahmen und Behandlung der Blutproben**

Venenkatheter:

- Venenverweilkatheter Optiva ® 2,18G, Medex
- Mehrweghahn Discifix C-3 blau, B.Braun

Zur Verwerfung:

- 2ml Spritzen LUER ONCE

Für die Bestimmungen:

- Trasylol 2'000'000 KIE Proteaseinhibitor, BAYER
- DPP-IV-Inhibitor Catalog #: DPP4, DPP4-010. 10ul/ml Blut, LINCO Research
- S-Monovette 2,6ml K3E 1.6mg EDTA/ml Blut Violett. Das Original, Sarstedt
- S-Monovette 7,5ml K3E 1.6mg EDTA/ml Blut Violett. Das Original, Sarstedt

- Tubes für die Laboranalyse

Für die Glukosebestimmungen:

- 1ml Tuberkulinspritzen, LUER 0,01, PRIMO
- Ascensia® Microfill® Teststreifen mit Ascensia® *CONTOUR*® Blutzucker-messgerät

Für die NaCl-Spülung:

- NaCl 0,9% B.Braun
- 2ml Spritzen LUER ONCE

## **3.4 Bestimmungen**

### **3.4.1 Glukosebestimmung**

Die Glukosebestimmung wurde mit den Teststreifen und den Blutzuckermessgeräten der Marke „Ascensia“ durchgeführt

#### Prinzip

Hexokinase-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase: Die im Blut enthaltenen Glukosemoleküle reagieren mit der FAD-Glucose-Dehydrogenase und dem Hexocyanoferrat (III) in den Teststreifen. Dabei entstehen elektrische Ströme, welche vom Messgerät erfasst werden und sich direkt proportional zu dem in der Probe enthaltenen Blutzucker verhalten.

### **3.4.2 Insulinbestimmung**

Die Insulinbestimmung wurde mit einem käuflichen Radioimmunoassay der Marke INSULIN-CT durchgeführt.

#### Prinzip

Die mit Insulin-Antikörpern beschichteten Röhrchen werden mit dem zu untersuchenden Plasma gefüllt. Das darin enthaltene Insulin wird sich während der Inkubationszeit an die Antikörper binden. Die Röhrchen werden entleert und mit einer markiertes Insulin enthaltenden Lösung gefüllt, um nach einer erneuten Inkubationszeit

wieder geleert zu werden. Die nun gemessene Radioaktivität verhält sich umgekehrt proportional zu der im Plasma enthaltenen Menge Insulin.

### **3.4.3 GLP-1-Bestimmung**

Die GLP-1-Bestimmung wurde mit dem ELISA-Kit (enzyme-linked immuno sorbent assay) der Firma LINCO Research durchgeführt.

#### Prinzip

Auf einer Platte haftende monoklonale GLP-1-Antikörper binden das im Plasma vorkommende aktive GLP-1 am N-terminalen Ende. Danach wird das ungebundene Plasma gewaschen. Nun wird anti-GLP-1-alkaline Phosphatase beigefügt, welche sich an das auf der Platte immobilisierte GLP-1 bindet. Zuletzt wird MUP (Methyl-Umbelliferyl-Phosphat) hinzugefügt, welches durch die alkaline Phosphatase das fluoreszierende Umbelliferon freigibt. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zu der im Plasma enthaltenen Menge GLP-1.

## **4. Statistik**

### **4.1 Pharmakokinetik**

Die folgenden pharmakokinetischen Parameter wurden berechnet: die maximale Plasmakonzentration ( $C_{max}$ ) sowie das Zeitintervall zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration ( $T_{max}$ ). Die Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ) wurde geschätzt durch ein "non-compartmental" Verfahren durch Verwendung der WinNonlin Software (Version 5.01; Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

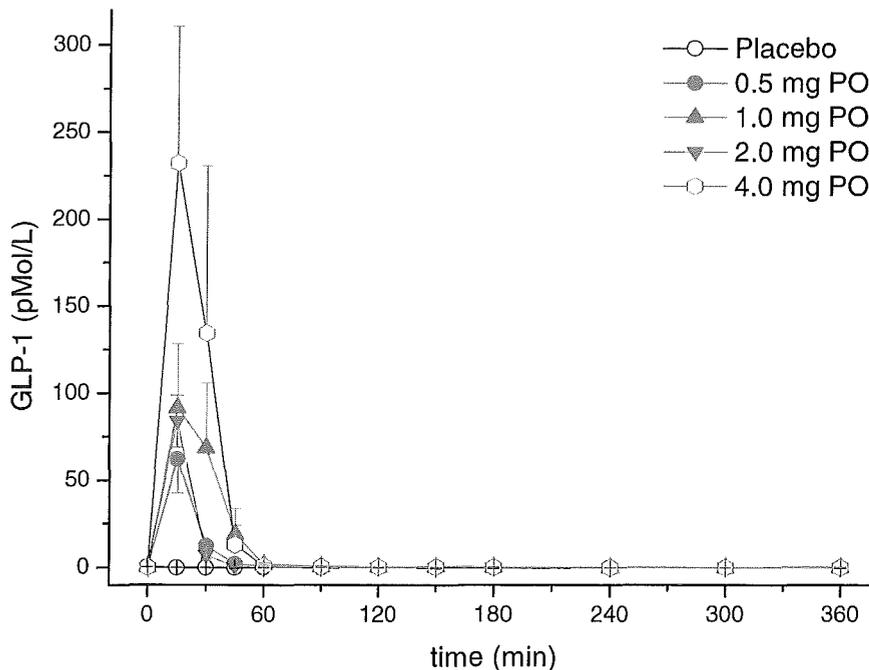
### **4.2 Statistische Analyse**

Die Darstellung der demographischen Parameter erfolgte rein deskriptiv (Alter, Gewicht, Grösse, BMI). Alle 6 Probanden konnten für die pharmakokinetische Analyse verwendet werden. Dosis-Proportionalität, AUC and  $C_{max}$  wurden durch lineare Regression bestimmt. Die verschiedenen pharmakokinetischen Parameter wurden mittels Varianz-Analyse (ANOVA) untereinander verglichen. Falls dabei statistisch signifikante Unterschiede errechnet wurden, wurde nach der ANOVA ein Dunnett Test (Dunnett's multicomparison) versus Placebo durchgeführt. Alle statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe von SPSS für Windows Applikationen (Version 14.0). Ein Unterschied wurde dann als statistisch signifikant betrachtet, wenn  $p < 0.05$  betrug. Die Daten werden als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) dargestellt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Plasmakonzentrationen von GLP-1

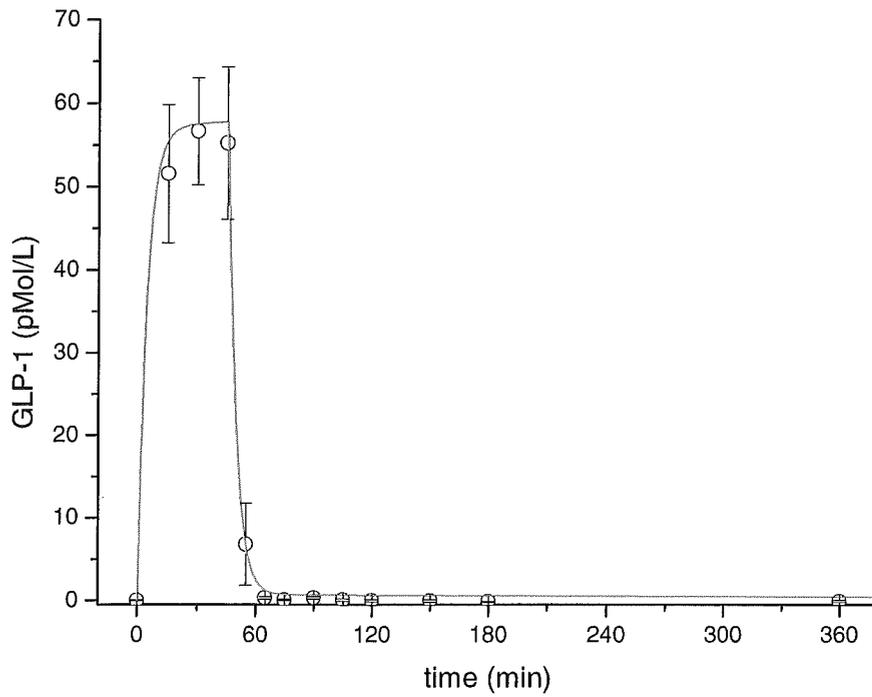
Die Verabreichung von aufsteigenden Mengen von oralem GLP-1 induzierte aufsteigende Plasma-Konzentrationen. In der folgenden Graphik sind die Plasmakonzentrationen von GLP-1 (Mittelwert $\pm$ SEM) vom Nullwert ausgehend auf der Zeitachse dargestellt. Der Nullwert wurde aus den beiden Messungen zu den Zeitpunkten -15 resp. -1 Minuten vor der GLP-1-Verabreichung ermittelt



Anhand dieser Graphik kann man den raschen Anstieg der GLP-1-Plasmakonzentration erkennen. Innerhalb von 15 – 35 Minuten nach Verabreichung waren die maximalen Werte erreicht. Danach nahm die Konzentration kontinuierlich ab. Nach ungefähr 60 Minuten erreichten die GLP-1-Konzentrationen wieder ihre Ausgangswerte, wie sie vor der GLP-1-Verabreichung, in nüchternem Zustand gemessen wurden.

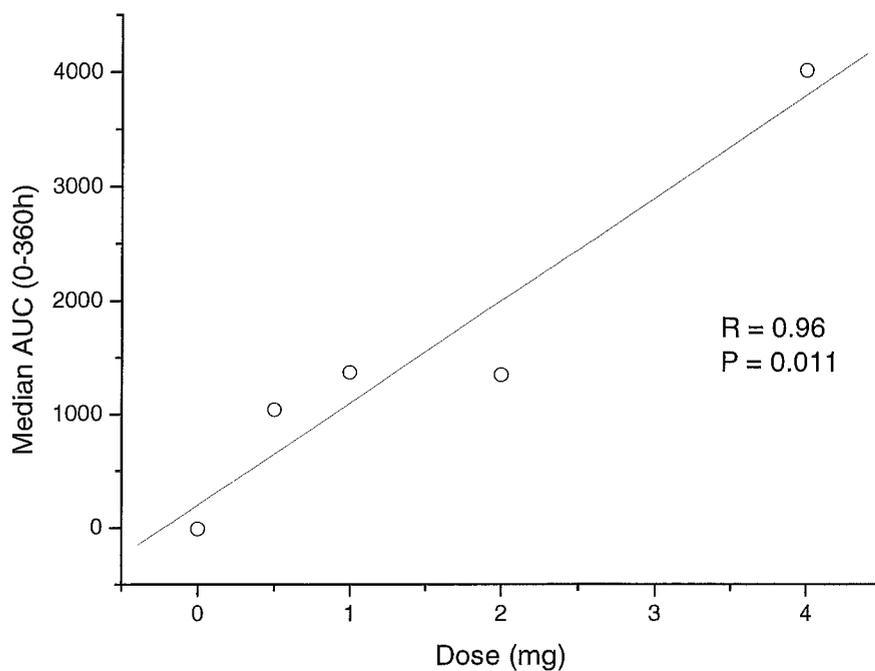
Bereits hier zeichnet sich ein linearer Anstieg der gemessenen Konzentrationen im Verhältnis zu den zunehmenden Dosierungen ab. Eine Ausnahme ergab sich bei der 2.0mg- Dosierung. Dies ist möglicherweise auf kleine Abweichungen während der Tablettenherstellung zurückzuführen.

## 5.2 GLP-1-Plasmakonzentrationen nach intravenöser Verabreichung



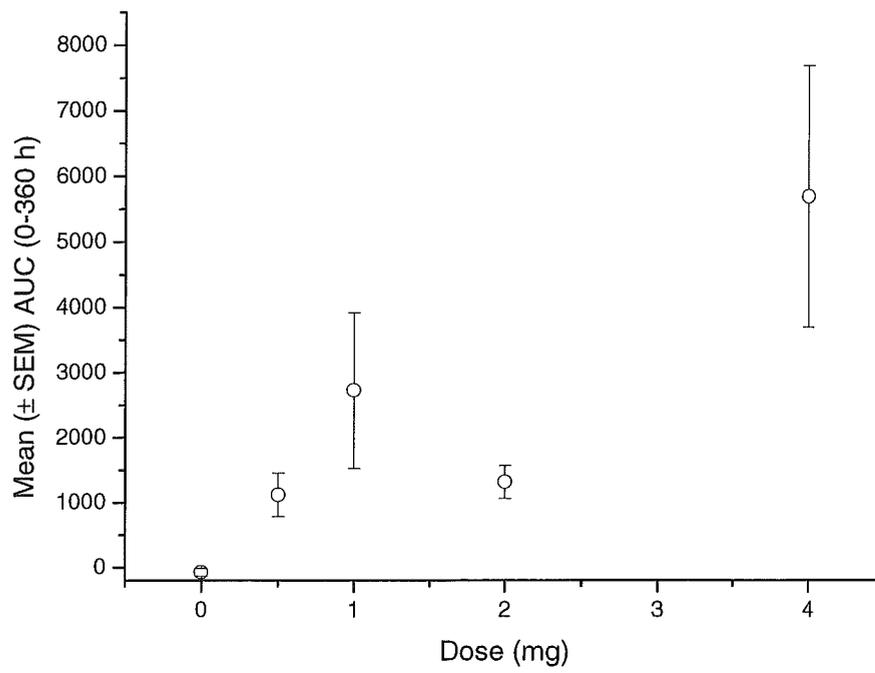
In dieser zweiten Abbildung sind die GLP-1 Konzentrationen nach Infusion des Peptids über 45 Minuten dargestellt. Der Vergleich mit oraler Verabreichung zeigt, dass die unteren zwei oralen Dosen ähnlich hohe Blutspiegel erzeugt haben.

### 5.3 Verhältnis der Dosierung zu den AUC-Medianwerten (0-360')

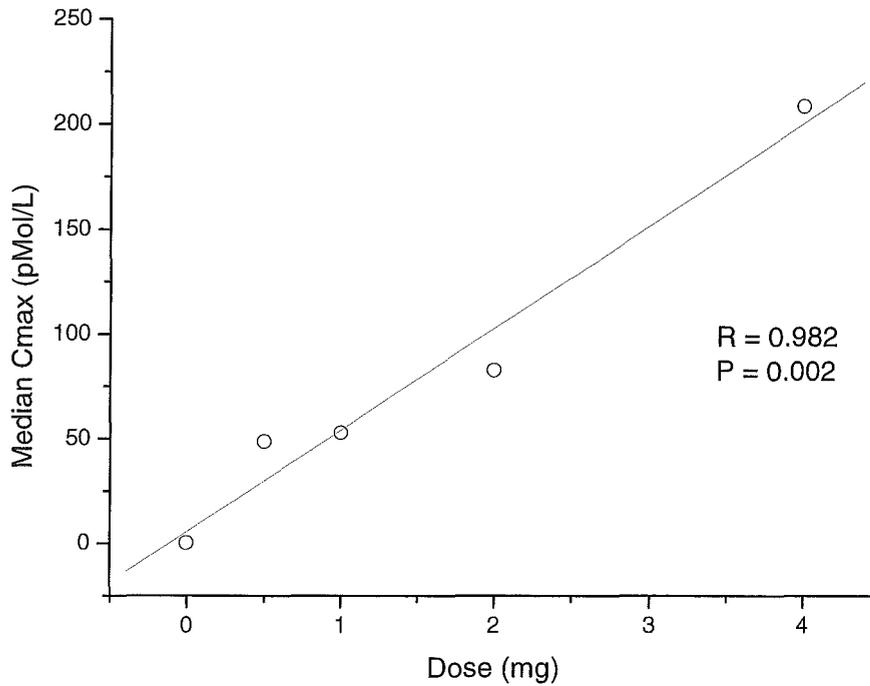


Für die Mediane der Flächen unter der Kurve (AUC = area under the curve) der Plasmakonzentrationen kann ein lineares Verhältnis zur Dosierung aufgezeigt werden.

## 5.4 Verhältnis der Dosierung zu den AUC-Mittelwerten (0-360')

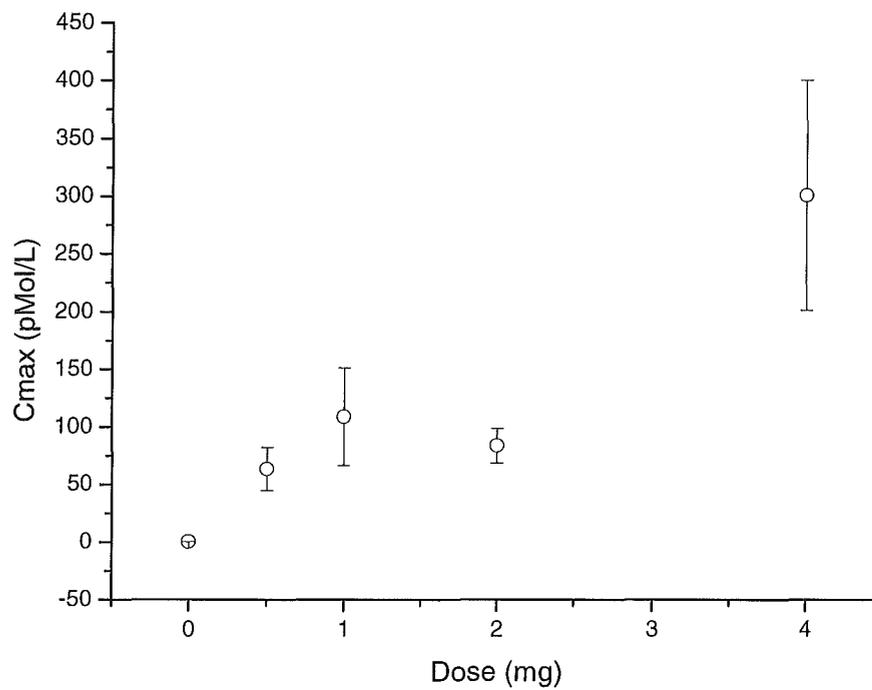


## 5.5 Verhältnis der Dosierung zu den Medianwerten der maximalen GLP-1-Plasmakonzentrationen (C<sub>max</sub>-Median)



Wie für die AUC-Mediane kann für die Mediane der maximalen GLP-1-Plasmakonzentrationen (C<sub>max</sub>) eine lineare Proportionalität zur verabreichten Dosierung aufgezeigt werden.

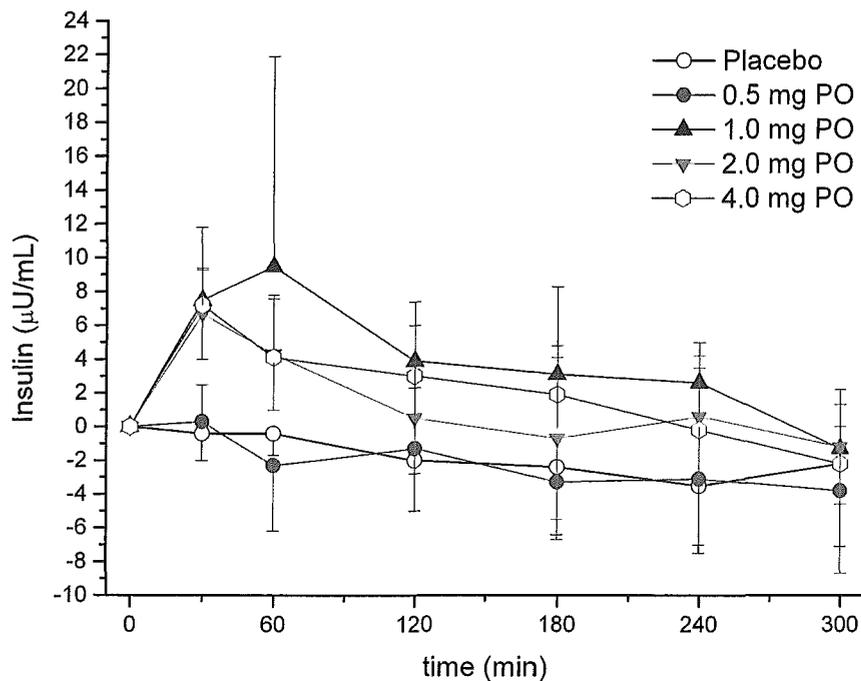
## 5.6 Verhältnis der Dosierung zu den Mittelwerten der maximalen GLP-1-Plasmakonzentrationen (C<sub>max</sub>-Mittelwert)



## **5.7 Zeitpunkte der maximalen GLP-1-Plasmakonzentrationen (Tmax)**

Die maximalen Plasmakonzentrationen waren, unabhängig von der verabreichten Dosis, nach ungefähr 15 – 20 Minuten erreicht. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Resorptionskapazität des Magendarmtrakts Auslastungsgrenzen aufweist und sich auch mit höheren GLP-1-Dosierungen nicht mehr steigern lässt.

## 5.8 Insulin-Plasmakonzentrationen nach oraler GLP-1-Verabreichung



Es kann keine Proportionalität der Insulinwerte zu den verabreichten GLP-1-Dosierungen nachgewiesen werden. Die Insulinausschüttung stieg vor allem ab der zweiten Dosierung, 1.0 mg GLP-1/kg Körpergewicht, deutlich an, steigerte sich jedoch bei höheren Dosierungen kaum noch.

## 6. Diskussion

Die pharmakokinetischen Untersuchungen der vorliegenden Studie, welche an sechs jungen, männlichen Probanden durchgeführt wurden, haben eine dosisabhängige Absorption des GLP-1 sowie eine Stimulation der Insulinausschüttung nach oraler Verabreichung des Peptids gezeigt.

Aufgrund dieser Resultate kann nun auch das GLP-1 in die Liste der oral absorbierbaren Peptiden aufgenommen werden. Dank dem Prinzip der Carrier-Moleküle ist das GLP-1 vor den Verdauungsenzymen geschützt und genug lipophil, um von der intestinalen Mukosa aufgenommen werden zu können. Dabei bleibt das Peptid unverändert und somit aktiv. Im Verhältnis zur intravenösen Verabreichung beträgt die Bioverfügbarkeit bei oraler GLP-1-Verabreichung im Schnitt 4%. Die Werte schwankten zwischen 1 und 10%.

Die höchsten Konzentrationen stellten sich bei allen Dosierungen nach 15 – 35 Minuten ein, was zeigt, dass die Absorption sehr rasch erfolgt. Die beobachteten Konzentrationen sind teilweise klar pharmakologische Werte: nach einer 1500 kcal Mahlzeit wurden bei gesunden Probanden maximale GLP-1 Konzentrationen von 60-100 pmol/l beobachtet. Ähnliche Konzentrationen konnten mit einer Infusion von GLP-1 zu einer Dosierung von 0.4 pmol/kg pro Minute erzeugt werden.<sup>8</sup>

Zwischen den GLP-1-Plasmakonzentrationen nach physiologischer, nahrungsinduzierter GLP-1-Ausschüttung und oraler GLP-1-Verabreichung waren deutliche Unterschiede erkennbar. Die grösste Differenz wurde bei der höchsten oralen Dosierung von 4.0mg GLP-1 festgestellt. Die maximalen GLP-1-Plasmakonzentrationen ( $C_{max}$ ) betrugen  $300,6 \pm 99,4$  pMol/L. Diese hohen Konzentrationen sind für die möglichen therapeutischen Anwendungen von grosser Bedeutung.

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die im systemischen Kreislauf gemessenen Konzentrationen tiefer sind als die im splanchnischen Blut. In einer unpublizierten Arbeit in Ratten waren die Pfortaderwerte für GLP-1 nach oraler Verabreichung drei mal höher als die systemischen GLP-1-Konzentrationen, was auf eine markante Leberextraktion schliessen lässt (Ehud Arbit, persönliche Mitteilung). Daraus lässt sich ableiten, dass eine orale, therapeutische Anwendung von GLP-1 seine Wirkung vorwiegend lokal im Gastrointestinaltrakt erzielen könnte, ohne dabei wesentliche unerwünschte, systemische Nebenwirkungen hervorzurufen.

Die Insulinausschüttung stieg nach der oralen GLP-1-Verabreichung an und erreichte Werte bis zu 24  $\mu\text{U}/\text{ml}$ , wobei jedoch eine dosisabhängige Proportionalität nicht nachgewiesen werden konnte. Die erhöhte Insulinkonzentration im Plasma hielt etwa 60 Minuten an und fiel danach wieder ab. Die  $C_{\text{max}}$ -Werte von Insulin stiegen zwischen der GLP-1-Dosierung von 0,5mg und 1,0mg an, während sie bei den nächst höheren Dosierungen nicht mehr weiter anstiegen. Daraus lässt sich schliessen, dass die Insulinausschüttung ein maximales Niveau erreicht hatte, und sich auch trotz stärkerer Stimulation durch höhere GLP-1-Konzentrationen nicht mehr steigern liess. Eine stärkere Stimulation der Insulinsekretion ist nur bei höheren Glucosewerten zu erwarten. Die höchsten Werte wurden ca. 45 Minuten nach der oralen GLP-1-Gabe gemessen ( $T_{\text{max}}$ ).

Wie aus früheren Studien über das GLP-1 schon bekannt war, bestanden die unerwünschten Nebenwirkungen hauptsächlich aus Übelkeit, Völlegefühl und Schwitzen. Diese Effekte waren ganz klar dosisabhängig und traten bei der oralen Dosis von 4.0 mg GLP-1 auf, wobei die Plasmakonzentrationen mehr als 150 pMol GLP-1/l betragen. Bei tieferen Dosierungen traten keine Nebenwirkungen auf. Alle Nebenwirkungen verschwanden nach wenigen Minuten, was mit der kurzen Halbwertszeit des Peptids erklärt werden kann.

Die vorliegenden Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden: GLP-1 kann durch geeignete Verpackung mit SNAC aus dem Magendarmtrakt absorbiert werden. Die Absorption ist dosisabhängig und bewirkt eine Freisetzung von Insulin. Die erzielten Plasmakonzentrationen liegen im pharmakologischen Bereich, sodass eine therapeutische Anwendung möglich erscheint. Auf Grund seiner biologischen Wirkungen eignet sich GLP-1 primär für die Behandlung von Typ 2 Diabetes (Stimulation der Insulinsekretion, Verminderung der Insulinresistenz). Da das Peptid auch den Appetit zu reduzieren vermag, ist eine Anwendung auch bei Übergewicht und Adipositas denkbar.

Die intravenöse oder subkutane Verabreichung ist für länger dauernde Behandlungen auf Grund der aufwändigeren Applikation und kurzen Halbwertszeit ungeeignet. Mit den Daten aus vorliegender Studie kann aufgezeigt werden, dass die orale Verabreichung und intestinale Absorption dank dem Carrier-Molekül SNAC nicht nur möglich ist, sondern eine neue potentielle Applikationsmöglichkeit darstellt.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Gutzwiller J.P., Degen L., Heuss L., Beglinger C. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and eating. *Physiology and behavior*, 2004;31-37.
2. Woods S. Gastrointestinal Satiety Signals. I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G7-G13, 2004.
3. Strader A., Woods S. Special reports and reviews. Gastrointestinal Hormones and Food Intake. *Gastroenterology* 2005;128:175-191.
4. Holst JJ. Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol* 1997;59:257-271.
5. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucosedependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide-1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 1995;136:3585-3596.
6. Giralt M, Vergara P. Glucagonlike peptide-1 (GLP-1) participation in ileal brake induced by intraluminal peptones in rat. *Dig dis Sci* 1999;44:322-329.
7. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, Schmiegel WH. Glucagon-like peptide-1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am Physiol Soc* 1997:E981-E988.
8. Gutzwiller JP, Goke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer , Handschin D, Winterhalder R, Conen D, Beglinger C. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut* 1999;44:81-86.
9. Naslund E, Barkeling B, King N, Gutniak M, blundell JE, Holst JJ, Rossner S, Hellstrom PM. Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:304-311.
10. Toff-Nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ. Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999;22:1137-1143.
11. Gutzwiller JP, Drewe J, Goke B, Schmidt H, Rohrer B, Lareida J, Beglinger C. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am J Physiol* 1999;276:R1541-R1544.
12. Kintzig KP, D'Alessio DA, Seeley RJ. The diverse roles of CNS GLP-1 in the control of food intake and the mediation of visceral illness. *J Neurosci* 2002;22:10470-10476.
13. Larsen PJ, Tang-Christensen M, Jessop DS. Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 1997;138:4445-4455.

14. McMahon LR, Wellman PJ. Decreased intake of a liquid diet in nonfood-deprived rats following intra-PVN injections of GLP-1(7-36) amide. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:673-677.
15. McMahon LR, Wellman PJ. PVN infusion of GLP-1-(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *Am J Physiol* 1998;274:R23-R29.
16. Thiele TE, Van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Woods SC, Bernstein IL, Seeley RJ. Central infusion of GLP-1, but not leptin, produces conditioned taste aversions in rats. *Am J Physiol* 1997;272:R726-R730.
17. Rinaman L. A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia. *Am J Physiol* 1999;277:R1537-R1540.
18. van Dijk G, Thiele TE, Seeley RJ, Woods SC, Bernstein IL. Glucagon-like peptide-1 and satiety? *Nature* 1997;385:214
19. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding (see comments). *Nature* 1996;379(6560):69-72.
20. Beglinger C, Gutzwiller JP, Vogel D. Einfluss von intravenös appliziertem Glucagon-like Peptid-1 (GLP-1) auf die NaCl-Ausscheidung nach salzreicher Mahlzeit bei gesunden Probanden. Inaugurationsdissertation, Promotion 17. Februar 2006
21. Arbit E, Goldberg M, Gomez-Orellana I, Majuru S. Oral heparin: status review. *Thromb J* 2006;4:6.
22. Rubinstein A, Radai R, Friedman M, Fischer P, Rokem JS. The effect of intestinal bacteria adherence on drug diffusion through solid films under stationary conditions. *Pharm Res* 1997;14(4):503-7.
23. Donovan MD, Flynn GL, Amidon GL. The molecular weight dependence of nasal absorption: the effect of absorption enhancers. *Pharm Res* 1990;7(8):808-15
24. Kidorn M, Dinh S, Menachem Y, Abbas R, Variano B, Goldberg M, et al. A novel per-oral insulin formulation: proof of concept study in non-diabetic subjects. *Diabet Med* 2004;21(4):354-7.
25. Bernkop-Schnurch A, Walker G. Multifunctional matrices for oral peptide delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001;18.
26. Gomez-Orellana I. Strategies to improve oral drug bioavailability. *Expert Opin Drug Deliv* 2005;2(3):419-33
27. Buclin T, Cosma Rochat M, Burckhardt P, Azria M, Attinger M. Bioavailability and biological efficacy of a new oral formulation of salmon calcitonin in healthy volunteers. *J Bone Miner Res* 2002;17(8):1478-85.

## 8. Anhang

- Abb. 1 Screeningformular
- Detaillierte Beschreibung des Versuchsablaufs
- Mengen der Blutentnahmen
- Abb. 2 Übersicht Blutentnahmen (GLP-1 oral)
- Abb. 3 Übersicht Blutentnahmen (GLP-1 intravenös)
- Abb. 4 Flowsheet (GLP-1 oral)
- Abb. 5 Flowsheet (GLP-1 intravenös)
- Tabellen:
  - AUC, 0-360 Min.
  - Maximale GLP-1-Plasmakonzentrationen (C<sub>max</sub>)
  - Zeitpunkte der maximalen GLP-1-Plasmakonzentrationen (T<sub>max</sub>)



## **Detaillierte Beschreibung des Versuchsablaufs**

Geplant war ursprünglich, dass die Studie für jede Versuchsperson aus sechs Versuchstagen mit oraler GLP-1-Einnahme und einem Tag mit intravenöser Verabreichung bestehen würde. Dazwischen war eine versuchsfreie Zeit von mindestens drei Tagen vorgesehen. Tatsächlich aber wurden von den fünf Versuchstagen mit oraler GLP-1-Einnahme nur deren vier durchgeführt, da die Studie vorzeitig abgebrochen werden musste. Bei der vorgesehenen zweithöchsten Dosierung, nämlich 4mg GLP-1, empfanden zwei von den sechs Probanden Übelkeit, wobei einer erbrechen musste. Daraufhin wurde entschieden den letzten der geplanten Versuchstage, mit der Dosierung von 8 mg, nicht mehr durchzuführen.

Jede Woche wurden zwei Versuchstage mit je drei Probanden pro Tag durchgeführt. Ein Versuchstag bestand aus einem ca. 7-stündigem Aufenthalt im Clinical Research Center (CRC) am Universitätsspital Basel. Die Probanden trafen jeweils um 07.30 Uhr in nüchternem Zustand ein und wurden um ca.14.30 Uhr entlassen. Sie durften jeweils am Vorabend, ab 22.00 Uhr, ausser Wasser nichts mehr zu sich nehmen. Am Morgen durfte in der Zeit von einer Stunde vor, bis zwei Stunden nach der Tabletteneinnahme – abgesehen von der definierten Trinkmenge bei der eigentlichen Tablettenverabreichung – ebenfalls kein Wasser getrunken werden.

Morgens beim Eintreffen wurde ihnen ein Venenverweilkatheter an einem Vorderarm gesetzt, und sie wurden dazu angehalten, sitzen zu bleiben. Nach den ersten beiden Blutentnahmen und Glukosemessungen wurden die Tabletten um ca. 08.15 Uhr mit 150ml Wasser eingenommen. Am ersten Tag nahmen die Versuchspersonen eine Plazebetablette ein, worüber sie aufgeklärt worden waren. In den darauf folgenden vier Wochen wurden die GLP-1/SNAC-Tabletten in aufsteigender GLP-1-Dosierung von 0.5mg, 1mg, 2mg und 4mg verabreicht.

In regelmässigen Intervallen wurden Blutentnahmen durchgeführt zur Messung der GLP-1- und Insulinkonzentrationen. Die 13 Blutentnahmen über den Venflon erfolgten während der gesamten Versuchsdauer in exakt definierten Zeitabständen zu den Tablettenaufnahmen: -15', -1', + 15', + 30', + 45', + 60', + 90', + 120', + 150', + 180', + 240', + 300', + 360'. Bei den 8 Zeitintervallen; -15', -1', + 30', + 60', + 120', + 180', + 240', + 360' wurde mit Hilfe einer Tuberkulinspritze aus jeweils etwa 0.1ml Blut, mittels Glukoseteststreifen, der Blutglukosespiegel bestimmt. Nach jeder Blutentnahme wurde der Venflon mit zwei ml NaCl gespült, um die Bildung von Gerinnseln zu verhindern. Bei den Blutentnahmen wurden zuerst jeweils zwei ml Blut in eine Spritze aufgezogen und dann verworfen. Damit konnten Verdünnungsfehler durch das zur Spülung verwendete NaCl verhindert werden.

Die eigentlichen Blutabnahmen wurden in verschiedene EDTA-Monovetten abgefüllt, wofür an den ersten zwei Versuchstagen drei 2,6ml-Monovetten, je eine für das GLP-1, für das Insulin und für Reserven verwendet wurden. Zur Vereinfachung der Versuchsabwicklung wurden für die letzten Versuche jeweils 2,6ml-Monovetten für die erste GLP-1-Bestimmung und 7,6ml-Monovetten für eine zweite GLP-1-Bestimmung sowie für die Insulinbestimmung und für Reserven eingesetzt. In die 2,6ml-Monovetten wurden vor den Blutabnahmen 0,13ml und in die 7,6ml-Monovetten 0,380ml Trasyolol beigegeben. Zusätzlich wurden die für die GLP-1-Messung bestimmten 2,6ml-Monovetten mit 0,026ml DPP-IV-Inhibitor abgefüllt, um den Abbau des GLP-1 durch die Dipeptid-peptidase IV zu verhindern. Durch dieses Verfahren konnte das GLP-1 doppelt bestimmt werden; einmal mit und einmal ohne DPP-IV-Inhibitor im benutzten Plasma.

Die mit Blut gefüllten Monovetten wurden sofort nach der Entnahme auf Eis gekühlt und dann während 10 Minuten bei 4°C und 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach diesem Vorgang wurde in den ersten Versuchstagen das Plasma wie folgt auf verschiedene Tubes aufgeteilt: Mindestens 1ml Plasma aus der mit DPP-IV-Inhibitor versehenen Monovette in ein mit GLP-1 gekennzeichnetes Tube, 0,4ml in ein Tube für die Insulinbestimmung (nur zu den 8 Zeitpunkten, an welchen auch die Glukosebestimmung vorgenommen wurde) und das restliche Plasma aus eben dieser Monovette und aus der dritten 2,6ml-Monovette in zwei Reserve-Tubes, welche mit „Reserve 1“ und „Reserve 2“ beschriftet wurden.

An den restlichen Versuchstagen wurde grundsätzlich gleich vorgegangen. Es wurden jedoch zwei der drei 2,6ml-Monovetten durch eine 7,6ml-Monovette ersetzt. Aus dieser wurde das Plasma für die zweite GLP-1-Messung, für die Insulinbestimmung und für die Reserven abgenommen. Alle Tubes wurden sofort auf Trockeneis gefroren und dann bis zur Dosierung durch das Labor bei -20°C gelagert.

Am Versuchstag der intravenösen GLP-1-Applikation wurden zwei Venenverweilkatheter, einer an jedem Vorderarm, gesetzt. Über den einen wurde während 45 Minuten die GLP-1-Lösung mit einer Konzentration von 0.4 pmol/kg\*min eingeführt. Über den anderen erfolgten die Blutentnahmen zu den Zeitpunkten -15', -1', + 15', + 30', + 45', + 55', + 65', + 75', + 90', + 105', + 120', + 150', + 180' und 360'. Die Vorgehensweise und das Material waren dieselben.

Die Versuchspersonen durften sich zwei Stunden nach der Tabletteneinnahme hinlegen, falls sie dies wünschten, und sie durften auch wieder Wasser zu sich nehmen. Nach der letzten Blutentnahme zum Zeitpunkt + 360' durften sie das CRC verlassen.

## Mengen der Blutentnahme

Die Daten in der Übersicht verstehen sich pro Proband und Versuchstag.

### Erste zwei Versuchstage:

- Verwerfung 13x 2ml Spritzen (ca. 1ml aufgezogen)
- GLP-1 Bestimmung 13x 2,6ml EDTA-Monovetten + 0,13ml Trasylol +  
0,026ml DPP-IV Inhibitor
- Insulinbestimmung 8x 2,6ml EDTA-Monovetten + 0,13ml Trasylol
- Reserve 1 und 2 13x 2,6ml EDTA-Monovetten + 0,13ml Trasylol
- Glukosebestimmung 8x 1ml Tuberkulinspritzen (nur 0,1ml gefüllt)

Total abgenommene Blutmenge pro Versuchstag: 102,2ml

$(13 \times 1 \text{ml}) + (13 \times 2,6 \text{ml}) + (8 \times 2,6 \text{ml}) + (13 \times 2,6 \text{ml}) + (8 \times 0,1 \text{ml})$

Total abgenommene Blutmenge in zwei Versuchstagen:  $102,2 \text{ml} \times 2 = 204,4 \text{ml}$

### Dritter und vierter Versuchstag:

- Verwerfung: 13x 2ml Spritzen (ca. 1ml aufgezogen)
- GLP-1 Bestimmung 13x 2,6ml EDTA-Monovetten + 0,13ml Trasylol +  
0,026ml DPP-IV Inhibitor
- GLP-1- / Insulinbestimmung, Reserve 1 und 2  
13x 7,6ml EDTA-Monovetten + 0,38ml Trasylol
- Glukosebestimmung 8x 1ml Tuberkulinspritzen (nur 0,1ml gefüllt)

Total abgenommene Blutmenge pro Versuchstag: 146,4ml

$(13 \times 1 \text{ml}) + (13 \times 2,6 \text{ml}) + (13 \times 7,6 \text{ml}) + (8 \times 0,1)$

Total abgenommene Blutmenge in zwei Versuchstagen: 292,8ml

Tag der intravenösen GLP-1-Verabreichung:

- Verwerfung: 14x 2ml Spritzen (ca. 1ml aufgezogen)
- GLP-1 Bestimmung 14x 2,6ml EDTA-Monovetten + 0,13ml Trasylol +  
0,026ml DPP-IV Inhibitor
  
- GLP-1- / Insulinbestimmung, Reserve 1 und 2  
14x7,6ml EDTA-Monovetten+0,38ml Trasylol
- Glukosebestimmung 7x 1ml Tuberkulinspritzen (nur 0,1ml gefüllt)

Total abgenommene Blutmenge an dem Versuchstag: 157,5ml

$(14 \times 1 \text{ml}) + (14 \times 2,6 \text{ml}) + (14 \times 7,6 \text{ml}) + (7 \times 0,1)$

Bis auf die Glukosemessungen wurden alle Dosierungen durch das Labor des Departements Forschung am Universitätsspital Basel durchgeführt.

## Abbildung 2: Übersicht Blutentnahmen (GLP-1 oral)

### ORAL APPLICATION OF GLP-1: BLUTENTNAHMEN (27.9.06)

|           |           | BLUT      | BLUT    | BLUT                           | PLASMA      | BLUT            | PLASMA  | BLUT            | PLASMA      |             |
|-----------|-----------|-----------|---------|--------------------------------|-------------|-----------------|---------|-----------------|-------------|-------------|
|           |           | verwerfen | Glucose | GLP-1 aktiv                    | GLP-1 aktiv | Insulin+Res     | Insulin | Reserven        | Reserve 1   | Reserve 2   |
|           |           | Spritze   | Spritze | 2.6ml EDTA-R.                  | mind. 1.2ml | 2,6ml EDTA-R.+  | 0.4ml   | 2.6ml EDTA-R.+  | (+Ins-Rest) | (+Ins-Rest) |
| BE Nr.    | Zeitpunkt |           |         | 0.13ml Trasylol<br>26ul DPP-IV |             | 0.13ml Trasylol |         | 0.13ml Trasylol |             |             |
| 1         | -30'      | mind.1ml  | 0.5ml   | 2.6ml                          | mind. 1.2ml | 2.6ml           | 0.4ml   | 2.6ml           | ca. 1.0ml   | ca. 1.0ml   |
| 2         | 0'        | mind.1ml  | 0.5ml   | 2.6ml                          | mind. 1.2ml | 2.6ml           | 0.4ml   | 2.6ml           | ca. 1.0ml   | ca. 1.0ml   |
| 3         | 15'       | mind.1ml  |         | 2.6ml                          | mind. 1.2ml |                 |         | 2.6ml           | ca. 0.6ml   | ca. 0.6ml   |
| 4         | 30'       | mind.1ml  | 0.5ml   | 2.6ml                          | mind. 1.2ml | 2.6ml           | 0.4ml   | 2.6ml           | ca. 1.0ml   | ca. 1.0ml   |
| 5         | 45'       | mind.1ml  |         | 2.6ml                          | mind. 1.2ml |                 |         | 2.6ml           | ca. 0.6ml   | ca. 0.6ml   |
| 6         | 60'       | mind.1ml  | 0.5ml   | 2.6ml                          | mind. 1.2ml | 2.6ml           | 0.4ml   | 2.6ml           | ca. 1.0ml   | ca. 1.0ml   |
| 7         | 90'       | mind.1ml  |         | 2.6ml                          | mind. 1.2ml |                 |         | 2.6ml           | ca. 0.6ml   | ca. 0.6ml   |
| 8         | 120'      | mind.1ml  | 0.5ml   | 2.6ml                          | mind. 1.2ml | 2.6ml           | 0.4ml   | 2.6ml           | ca. 1.0ml   | ca. 1.0ml   |
| 9         | 150'      | mind.1ml  |         | 2.6ml                          | mind. 1.2ml |                 |         | 2.6ml           | ca. 0.6ml   | ca. 0.6ml   |
| 10        | 180'      | mind.1ml  | 0.5ml   | 2.6ml                          | mind. 1.2ml | 2.6ml           | 0.4ml   | 2.6ml           | ca. 1.0ml   | ca. 1.0ml   |
| 11        | 240'      | mind.1ml  | 0.5ml   | 2.6ml                          | mind. 1.2ml | 2.6ml           | 0.4ml   | 2.6ml           | ca. 1.0ml   | ca. 1.0ml   |
| 12        | 300'      | mind.1ml  |         | 2.6ml                          | mind. 1.2ml |                 |         | 2.6ml           | ca. 0.6ml   | ca. 0.6ml   |
| 13        | 360'      | mind.1ml  | 0.5ml   | 2.6ml                          | mind. 1.2ml | 2.6ml           | 0.4ml   | 2.6ml           | ca. 1.0ml   | ca. 1.0ml   |
| Blutmenge |           | mind.13ml | 4ml     | ca. 35ml Blut                  |             | ca.21ml Blut    |         | ca.34ml Blut    |             |             |
| Trasylol: |           |           |         | 1.7ml                          |             | 1.04 ml         |         | 1.69ml          |             |             |
| DPP-IV:   |           |           |         | 0.34ml                         |             |                 |         |                 |             |             |

Trasylol: 50ul/1ml Blut

DPP-IV: 10ul/1ml Blut

EDTA-Röhrchen Sarstedt: 1.2 / 2.6(USB) / (2.6) / 4.0 / 4.9 / 7.5 (USB) / (9.0) ml

Blutentnahme-Volumen: 107ml / Versuch resp. 642ml / 6 Versuche in 5 Wochen

Kosten für Trasylol: 50ml/70.-CHF 160ml/224.-

Kosten für DPP-IV: Preis für 10ml/500.-CHF ca.12ml à 600.-

### Abbildung 3: Übersicht Blutentnahmen (GLP-1 intravenös)

#### I.V.- APPLICATION OF GLP-1: BLUTENTNAHMEN (24.11.06)

|                  |           | BLUT             | BLUT         | BLUT  | PLASMA      | BLUT                               | PLASMA      |         |           |           |
|------------------|-----------|------------------|--------------|---|-------------|------------------------------------|-------------|---------|-----------|-----------|
|                  |           | verwerfen        | Glucose      | GLP-1 aktiv                                     | GLP-1 aktiv | GLP-1+Insulin+Res                  | GLP-1 aktiv | Insulin | Reserve 1 | Reserve 2 |
|                  |           | Spritze          | Spritze      | 2.6ml EDTA-R.<br>0.13ml Trasylol<br>26ul DPP-IV | mind.1.2ml  | 7,5ml EDTA-R.+<br>0.375ml Trasylol | mind. 1.2ml | 0.4ml   |           |           |
| BE Nr.           | Zeitpunkt |                  |              |   |             |                                    |             |         |           |           |
| 1                | -15'      | mind.1ml         | 0.5ml        | 2.6ml   | mind. 1.2ml | 7.5ml                              | mind. 1.2ml | 0.4ml   | ca.1.05ml | ca.1.05ml |
| 2                | -1'       | mind.1ml         | 0.5ml        | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml | 0.4ml   | ca.1.05ml | ca.1.05ml |
| 3                | 15'       | mind.1ml         |              | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml |         | ca.1.25ml | ca.1.25ml |
| 4                | 30'       | mind.1ml         |              | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml |         | ca.1.25ml | ca.1.25ml |
| 5                | 45'       | mind.1ml         | 0.5ml        | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml | 0.4ml   | ca.1.05ml | ca.1.05ml |
| 6                | 55'       | mind.1ml         |              | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml |         | ca.1.25ml | ca.1.25ml |
| 7                | 65'       | mind.1ml         | 0.5ml        | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml | 0.4ml   | ca.1.05ml | ca.1.05ml |
| 8                | 75'       | mind.1ml         |              | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml |         | ca.1.25ml | ca.1.25ml |
| 9                | 90'       | mind.1ml         |              | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml |         | ca.1.25ml | ca.1.25ml |
| 10               | 105'      | mind.1ml         |              | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml |         | ca.1.25ml | ca.1.25ml |
| 11               | 120'      | mind.1ml         | 0.5ml        | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml | 0.4ml   | ca.1.05ml | ca.1.05ml |
| 12               | 150'      | mind.1ml         |              | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml |         | ca.1.25ml | ca.1.25ml |
| 13               | 180'      | mind.1ml         | 0.5ml        | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml | 0.4ml   | ca.1.05ml | ca.1.05ml |
| 14               | 360'      | mind.1ml         | 0.5ml        | 2.6ml   | mind.1.2ml  | 7.5ml                              | mind. 1.2ml | 0.4ml   | ca.1.05ml | ca.1.05ml |
| <b>Blutmenge</b> |           | <b>mind.14ml</b> | <b>3,5ml</b> | <b>ca. 36.4ml Blut</b>                          |             | <b>ca.105ml Blut</b>               |             |         |           |           |
| <b>Trasylol:</b> |           |                  |              | <b>1.7ml</b>                                    |             | <b>1.04 ml</b>                     |             |         |           |           |
| <b>DPP-IV:</b>   |           |                  |              | <b>0.34ml</b>                                   |             |                                    |             |         |           |           |

**Trasylol:** 50ul/1ml Blut

**DPP-IV:** 10ul/1ml Blut

**Blutentnahme-Volumen / Person:** 159ml

**Kosten für Trasylol (für alle Versuchspersonen):** 50ml/70.-CHF; 7.07ml/9.89.-CHF x6 = 59.34CHF

**Kosten für DPP-IV (für alle Versuchspersonen):** Preis für 10ml/500.-CHF; ca.0.364ml/0.0073.-CHF x6 = 0.044CHF



## Abbildung 5: Flowsheet (GLP-1 intravenös)

### IV - Applikation von GLP-1 (Diss Cornelia Ganzoni)

Proband:

Initialen

Subj.nr.

Exp.

Dosis

Datum

| Zeitschema                | Infusion<br>GLP-1<br>0,8pmol/kg/min | Zeitplan | Istzeit | Proben-<br>nummer | Glucose-<br>bestimmung | 2.6ml EDTA<br>0.13ml Tras.<br>26ul DPP | 2.6ml EDTA<br>0.13ml Tras.    | 2.6ml EDTA<br>0.13ml Tras. | Bemerkungen |
|---------------------------|-------------------------------------|----------|---------|-------------------|------------------------|--|-------------------------------|----------------------------|-------------|
|                           |                                     |          |         |                   | Glucose mmol/l         | GLP-1 aktiv                            | Insulin (0.4ml)<br>+ Reserven | Reserve 1+2                |             |
| -15'                      |                                     |          |         | 1                 |                        |  |                               |                            |             |
| -1'                       |                                     |          |         | 2                 |                        |  |                               |                            |             |
| Start der<br>Infusion, 0' |                                     |          |         |                   |                        |  |                               |                            |             |
| 15'                       |                                     |          |         | 3                 |                        |  |                               |                            |             |
| 30'                       |                                     |          |         | 4                 |                        |  |                               |                            |             |
| 45'                       |                                     |          |         | 5                 |                        |  |                               |                            |             |
| 55'                       |                                     |          |         | 6                 |                        |  |                               |                            |             |
| 65'                       |                                     |          |         | 7                 |                        |  |                               |                            |             |
| 75'                       |                                     |          |         | 8                 |                        |  |                               |                            |             |
| 90'                       |                                     |          |         | 9                 |                        |  |                               |                            |             |
| 105'                      |                                     |          |         | 10                |                        |  |                               |                            |             |
| 120'                      |                                     |          |         | 11                |                        |  |                               |                            |             |
| 150'                      |                                     |          |         | 12                |                        |  |                               |                            |             |
| 180'                      |                                     |          |         | 13                |                        |  |                               |                            |             |
| 360'                      |                                     |          |         | 14                |                        |  |                               |                            |             |

**Tabelle: AUC, 0-360 Minuten**

| Subject | Placebo | 0.5 mg PO | 1 mg PO | 2 mg PO | 4 mg PO | 0.1 mg IV |
|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|-----------|
| 1       | -18.0   | 80.6      | 2021.6  | 2224.6  | 1509.5  | 4088.8    |
| 2       | -47.0   | 2268.3    | 5038.1  | 1304.7  | 2688.8  | 2489.2    |
| 3       | -8.3    | 1329.2    | 7526.3  | 439.9   | 13184.3 | 2743.5    |
| 4       | -1.1    | 1743.4    | 701.6   | 1377.7  | 10021.2 | 1982.1    |
| 5       | 1.1     | 748.1     | 479.4   | 1652.9  | 5318.7  | 1986.1    |
| 6       | -377.7  | 540.6     | 535.0   | 855.5   | 1354.9  | 2095.5    |
| Mean    | -75.2   | 1118.4    | 2717.0  | 1309.2  | 5679.6  | 2564.2    |
| Median  | -13.1   | 1038.6    | 1361.6  | 1341.2  | 4003.7  | 2292.4    |
| SD      | 149.2   | 813.1     | 2926.8  | 620.0   | 4905.9  | 806.8     |
| SEM     | 60.9    | 331.9     | 1194.9  | 253.1   | 2002.8  | 329.4     |

**Maximale GLP-1-Plasmakonzentrationen (Cmax)**

| Subject | Placebo | 0.5 mg PO | 1 mg PO | 2 mg PO | 4 mg PO | 0.1 mg IV |
|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|-----------|
| 1       | 0.3     | 5.3       | 69.0    | 133.0   | 95.0    | 97.6      |
| 2       | 0.1     | 120.2     | 244.2   | 89.2    | 168.2   | 56.5      |
| 3       | 0.1     | 39.7      | 238.5   | 25.7    | 607.5   | 61.6      |
| 4       | 0.4     | 118.2     | 36.8    | 76.1    | 603.4   | 46.9      |
| 5       | 0.0     | 56.6      | 27.8    | 108.7   | 248.7   | 43.5      |
| 6       | 0.7     | 41.0      | 36.8    | 69.6    | 80.9    | 50.3      |
| Mean    | 0.2     | 63.5      | 108.8   | 83.7    | 300.6   | 59.4      |
| Median  | 0.2     | 48.8      | 52.9    | 82.7    | 208.4   | 53.4      |
| SD      | 0.3     | 46.3      | 103.6   | 36.6    | 243.6   | 19.8      |
| SEM     | 0.1     | 18.9      | 42.3    | 14.9    | 99.4    | 8.1       |

## Zeitpunkte der maximalen GLP-1-Plasmakonzentrationen (Tmax)

| Subject | Placebo | 0.5 mg PO | 1 mg PO | 2 mg PO | 4 mg PO | 0.1 mg IV |
|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|-----------|
| 1       | 90.0    | 15.0      | 30.0    | 15.0    | 15.0    | 45.0      |
| 2       | 15.0    | 15.0      | 15.0    | 15.0    | 15.0    | 45.0      |
| 3       | 60.0    | 30.0      | 30.0    | 15.0    | 30.0    | 30.0      |
| 4       | 120.0   | 15.0      | 15.0    | 15.0    | 15.0    | 30.0      |
| 5       | 30.0    | 15.0      | 15.0    | 15.0    | 15.0    | 15.0      |
| 6       | 0.0     | 15.0      | 15.0    | 15.0    | 15.0    | 30.0      |
| Mean    | 52.5    | 17.5      | 20.0    | 15.0    | 17.5    | 32.5      |
| Median  | 45.0    | 15.0      | 15.0    | 15.0    | 15.0    | 30.0      |
| SD      | 46.2    | 6.1       | 7.7     | 0.0     | 6.1     | 11.3      |
| SEM     | 18.9    | 2.5       | 3.2     | 0.0     | 2.5     | 4.6       |