



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

“Cinetica dell'assorbimento sottocutaneo di analogo di insulina ad azione ultrarapida”

Relatore: Dott. Michele Schiavon

Laureando: Lorenzo Pinton

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Data di laurea: 23 settembre 2022



# Indice

Sommario	5
<b>1. Introduzione</b>	
1.1 Il diabete mellito	7
1.2 Terapia insulinica nel diabete	10
1.3 Insulina e analoghi	12
1.3.1 Analoghi di insulina ad azione ultrarapida: Faster-Aspart	14
1.4 Obiettivo della tesi	13
<b>2. Database e metodi</b>	
2.1 Database	17
2.1.1 Dataset 1	17
2.1.2 Dataset 2	20
2.2 Metodi	23
2.2.1 Modello di assorbimento sottocutaneo di insulina ad azione rapida	23
2.2.2 Stima parametrica	24
2.2.3 Identificazione del modello	27
<b>3. Risultati</b>	
3.1 Identificazione modello	29
3.1.1 Database 1	30
3.1.2 Database 2	31
3.2 Analisi statistica	34
<b>4. Conclusioni</b>	35
<b>5. Bibliografia</b>	37



# Sommario

In questa tesi è stato utilizzato un modello compartimentale relativo all'assorbimento sottocutaneo di insulina, precedentemente sviluppato per analoghi rapidi in soggetti diabetici di tipo 1 (T1D), per descrivere il processo di assorbimento sottocutaneo di un nuovo analogo ultrarapido di insulina (Faster-Aspart), recentemente commercializzato per la terapia del T1D, e di confrontarlo con il corrispettivo analogo rapido (Aspart).

Sono stati considerati per questo studio due trial clinici differenti, condotti su pazienti tra i 18 e i 64 anni affetti da T1D, ai quali sono stati somministrati un bolo sottocutaneo di insulina Aspart e Faster-Aspart e misurati i valori di concentrazione di insulina plasmatica. I dati medi di questi studi sono stati estratti e successivamente utilizzati per identificare il modello compartimentale proposto.

Il modello è stato capace di descrivere entrambe le insuline e stimare con precisione i parametri. In linea con le caratteristiche farmacocinetiche delle due insuline, il modello è stato capace di evidenziare differenze statisticamente significative tra alcuni parametri, evidenziando quindi la sua capacità di caratterizzare le proprietà di entrambi gli analoghi. Futuri sviluppi consistono nell'utilizzo di un database più ampio per poter caratterizzare la variabilità di assorbimento sottocutaneo di questa nuova insulina e l'utilizzo di queste informazioni per lo sviluppo di sistemi di supporto alla decisione clinica che impiegano questa insulina nella terapia del T1D.



# 1. Introduzione

## 1.1 Il diabete mellito

Le patologie più comuni del sistema pancreatico endocrino sono rappresentate da una famiglia di disordini metabolici nota come diabete mellito.

Il diabete è caratterizzato da concentrazioni plasmatiche di glucosio elevate (iperglicemia) dovute ad una assente o inadeguata secrezione di insulina e/o un'alterata risposta delle cellule bersaglio nei confronti dell'insulina[1].

Esistono diverse varianti:

- diabete tipo 1 (detto anche insulino-dipendente)
- diabete tipo 2 (detto anche non-insulino-dipendente)
- diabete gestazionale
- diabete monogenico (es. MODY, maturity-onset diabetes of the young)
- diabete secondario ad altra patologia (es. malattia del pancreas) o farmaci (es cortisone)[2]

Il diabete di tipo 1 e di tipo 2, le varietà più frequenti e note, sono accomunate dalla presenza di alti livelli di glicemia nel sangue. Di fatto racchiudono grandi differenze dal punto di vista eziologico e patogenico.

Il diabete di tipo 1 (T1D) è una condizione di insufficienza insulinica dovuta alla distruzione delle cellule pancreatiche beta. È una malattia autoimmune, in cui l'organismo non riconosce più le cellule beta come "self" e le attacca mediante anticorpi e globuli bianchi causandone la distruzione.

A causa di ciò, per questo tipo di diabete, è assolutamente necessaria una terapia a base di iniezioni di insulina perché in breve tempo il corpo non è più in grado di produrne[1].

Il diabete di tipo 2 (T2D) è noto anche come diabete insulino-resistente perché, nella maggior parte dei pazienti, i livelli plasmatici di insulina sono inizialmente normali o elevati. Nelle fasi più avanzate della patologia molti diabetici di tipo 2 diventano insulino resistenti e necessitano di iniezioni di insulina. In questo caso la terapia insulinica è non sempre necessaria, può eventualmente essere impiegata in modo occasionale. In questa categoria rientrano circa il 90% di tutti i casi di diabete[1].

I soggetti affetti da diabete mellito possono andare incontro a molte gravi complicanze. Generalmente quanto è maggiore la capacità di controllare il livello di glucosio nel sangue, tanto è minore la probabilità che queste complicanze si sviluppino o peggiorino.

Alti livelli di glucosio per lunghi periodi di tempo causano un restringimento dei vasi di piccolo e grande calibro, riducendo l'afflusso di sangue a diverse parti del corpo. Il restringimento dei vasi è dovuto a: un accumulo sulle pareti di sostanze derivate da zuccheri complessi (che causano l'ispessimento e la rottura dei vasi stessi), oppure ad un innalzamento delle sostanze grasse nel sangue.

L'anormale afflusso di sangue può causare:

- Ictus
- Infarto
- Insufficienze cardiache
- Angina (dolori transitori al torace dovuti ad una carenza di ossigeno nel muscolo cardiaco)
- Crampi
- Riduzione della vista
- Malattie renali croniche
- Lesioni cutanee
- Lesioni ai nervi

Gli elevati livelli di glucosio nel sangue possono inoltre causare disturbi del sistema immunitario dell'organismo, rendendo quindi i soggetti con diabete mellito particolarmente predisposti a contrarre infezioni batteriche e micotiche.[3]

In Italia la presenza e l'aumento negli ultimi anni dei casi di diabete comporta una spesa di circa l'8% del budget sanitario con un costo medio annuo per persona di circa 2800 €. L'elevato peso clinico e sociale della malattia diabetica si traduce in un considerevole impatto sul consumo di risorse.

Dallo studio ARNO su 31 ASL del centro-nord Italia e da uno studio DADA su un campione di 9 milioni di cittadini appartenenti a 21 ASL del centro-sud, è emerso che circa il 20-25% delle persone affette da diabete viene ricoverata almeno una volta all'anno. In presenza di tale patologia il rischio di ospedalizzazione è da 1.5 a 2.5 volte più elevato e la degenza media più lunga rispetto ad un individuo sano. I costi diretti (vedi figura 1) sono attribuibili prevalentemente ai ricoveri ospedalieri (50%), altre voci come costi relativi a terapie o presidi (strisce reattive, lancette, aghi e siringhe) sono poco rilevanti, rispettivamente il 7% e il 4%. Un controllo ottimale della glicemia unito ad uno stile di vita consapevole e ad aggiornati supporti terapeutici permetterebbero alle persone affette da diabete una convivenza con la malattia meno difficoltosa e precaria, producendo come effetto secondario un notevole abbattimento dei costi nella gestione del diabete come problema economico-sociale.[4]



## FATTORI CHE CONTRIBUISCONO AI COSTI SANITARI DIRETTI PER IL DIABETE (Osservatorio ARNO 2015)

- La maggior parte dei costi del diabete è legato alle ospedalizzazioni.
- I farmaci per il diabete incidono per il **7%**, i presidi per il **4%**.

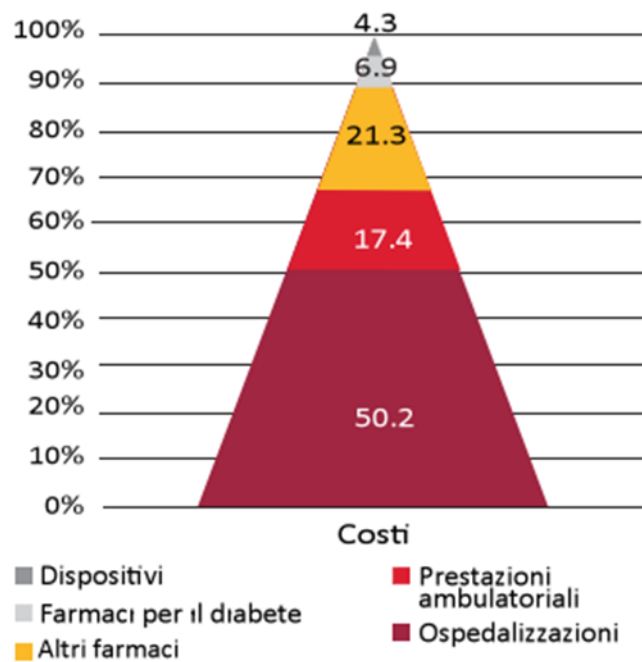


Figura 1: Suddivisione costi sanitari diretti per diabete mellito in Italia [4]

## 1.2 Terapia insulinica del diabete

In un soggetto sano, le cellule del pancreas rilasciano insulina in modo costante e proporzionale alle variazioni della glicemia. L'insulina secreta raggiunge innanzitutto il fegato, dove parte di essa viene estratta (in condizioni basali circa il 60%, ma può variare durante un pasto), mentre la quantità rimanente supera il fegato raggiungendo tutti gli altri tessuti periferici.

In un soggetto diabetico sottoposto a terapia insulinica, invece, l'ormone entra nel corpo attraverso una iniezione sottocutanea (in periferia) portando ad un afflusso minore del dovuto al fegato (riduzione gradiente portale-periferico) e in proporzione maggiore ai tessuti periferici. A causa di queste sostanziali differenze tra il processo fisiologico e una terapia iniettiva, il successo dell'assorbimento dell'insulina da parte dell'organismo varia tra le diverse somministrazioni e a seconda del sito di iniezione [2].

Il compito di una corretta terapia insulinica è conciliare la quasi normalizzazione della glicemia con la minore incidenza possibile di episodi ipoglicemici. Per raggiungere tale obiettivo è necessario uno schema terapeutico che riproduca in circolo il profilo insulinemico fisiologico, con picchi di insulina ai pasti e adeguati livelli insulinemici nei periodi interprandiali. Tale modello di terapia, nota come "bolo-basale", è realizzabile sia con un trattamento multiiniettivo che con l'infusione s.c. continua mediante microinfusore.

- La terapia insulinica multiiniettiva (MDI) prevede la somministrazione di boli di insulina ad azione rapida o ultrarapida ai pasti, per rispondere al fabbisogno insulinico prandiale (boli prandiali) e per correggere situazioni di iperglicemia durante la giornata. È prevista la somministrazione di una/due iniezioni di insulina ad azione intermedia-lenta, generalmente, a colazione/cena per rimpiazzare il fabbisogno insulinico basale (insulinemia basale).[5]



Figura 2: penna per insulina con selettore per il dosaggio [20]

In questa terapia vengono dunque utilizzati differenti analoghi, ossia diverse tipologie di insulina con parametri farmacocinetici (insorgenza d'azione, picco d'azione e durata d'azione) differenti. In particolare, le insuline “prandiali” sono somministrate prima dei tre pasti, in dosi pari al 10-15% del fabbisogno giornaliero per pasto, per evitare eccessive escursioni glicemiche postprandiali. Le insuline attualmente utilizzate per tale scopo sono l'insulina umana rapida regolare e gli analoghi dell'insulina lispro, aspart e glulisina. Le insuline “basali” sono ad azione intermedia o lenta, con lo scopo di mantenere nella norma i valori glicemici negli intervalli tra i pasti e nel periodo notturno.[5]

- L'infusione insulinica s.c. continua con microinfusore (CSII) risulta la miglior terapia insulinica che più si avvicina a mimare il profilo insulinico di un soggetto sano. Il microinfusore è un piccolo dispositivo computerizzato collegato al tessuto s.c. addominale attraverso un catetere che termina con un ago cannula. Il microinfusore eroga insulina, esclusivamente ad azione rapida o ultrarapida, in modo semicontinuo nelle 24 ore e con velocità variabile nell'arco della giornata secondo le esigenze individuali (condizioni post-prandiali o di digiuno). [5]



Figura 3: Sistema integrato composto da sensore e pompa ad infusione [16]

Rispetto alla terapia MDI, la CSII permette di ridurre la variabilità glicemica, il fabbisogno insulinico e la frequenza di ipoglicemia severa grazie alla miglior adattabilità di infusione di insulina. Visti i costi elevati della terapia CSII il suo utilizzo è limitato, viene indicata nei pazienti dove la terapia MDI fallisce o che necessitano di uno stile di vita più flessibile.[5] Trova un largo impiego anche per gli infanti (T1D), grazie alla capacità di rilasciare piccole dosi di insulina adattandosi al loro regime di alimentazione molto frammentato e frequente. Molto versatile anche per il trattamento di bambini spaventati dagli aghi. [6]

## 1.3 Insulina e analoghi

L'insulina nativa è un ormone secreto dalle cellule beta delle isole di Langerhans nel pancreas dei soggetti sani. È costituita da due catene di amminoacidi (catena A e B) unite da due ponti solfuro. Viene prodotta come pro-ormone inattivo e attivato prima della secrezione. Il glucosio costituisce lo stimolo principale per il rilascio di insulina. I tessuti bersaglio sono principalmente il fegato, il tessuto muscolare e adiposo. Invece, cellule costituenti cervello, reni, intestino e altri tessuti sono insulino indipendenti.[6]

Mediante tecniche di ingegneria genetica è stato possibile produrre e modificare la molecola dell'insulina umana, ricavando gli analoghi ad azione rapida o lenta.[15] Sulla base delle caratteristiche farmacocinetiche delle insuline applicate in ambito terapeutico è possibile operare una classificazione e una diversificazione nel loro impiego.

Tipo di Insulina	Inizio	Picco	Durata d'azione
<i>Ad azione rapida</i>			
Insulina umana Regolare (Actrapid, Humulin R)	30-60 min	2-3 h	5-8 h
<i>Analoghi ad azione rapida</i>			
Lispro (Humalog), Aspart (Novorapid)	5-15 min	30-90 min	5 h
<i>Ad azione intermedia</i>			
Insulina umana NPH (Protaphane, Humulin I)	2-4 h	4-10 h	10-16 h
Insulina umana Lenta (Humulin L, Monotard)	2-4 h	4-12 h	12-18 h
<i>A lunga durata d'azione</i>			
Insulina umana ultralenta (Humulin U, Ultratard)	6-10 h	10-16 h	18-24 h
<i>Analoghi ad azione ritardata</i>			
Glargine (Lantus)	2-4 h*	Senza picco	20-24 h

Figura 4: Tipologie di insulina applicate nel trattamento del diabete mellito [14]

Insuline che presentano tempi di assorbimento brevi sono indicate per il controllo della glicemia durante un pasto e/o eventi iperglicemici (ad azione rapida), mentre per il controllo della glicemia nelle fasi di digiuno o post-assorbimento, sono indicate insuline ad azione intermedia o lenta.

- **Insulina ad azione rapida**

L'insulina umana (regolare), quando iniettata attraverso il tessuto sottocutaneo genera un picco insulinico ad ascesa lenta (2-3 h) e di durata protratta (5-8 h), esponendo così il paziente, al rischio di iperglicemia nella fase immediatamente postprandiale e di ipoglicemia nella fase postprandiale tardiva. Gli analoghi di insulina ad azione rapida, per es. lispro e aspart, vengono assorbiti più rapidamente dell'insulina umana regolare, producendo un picco insulinico più rapido (30-90 min, Fig. 5) ed una scomparsa più rapida dal circolo ematico (5 h).[14]

- **Insulina ad azione intermedia e lenta**

Le insuline ad azione intermedia (NPH) o ad azione lenta, utilizzate come insuline basali nella terapia multiiniettiva, non sempre riescono a mimare il profilo insulinico basale. In particolare, le insuline NPH presentano comunque un picco di azione (4-10 h, Fig. 5), sebbene di entità minore rispetto agli analoghi rapidi, che potrebbe contribuire all'ipoglicemia (specialmente nelle fasi notturne se iniettata prima di coricarsi). I nuovi analoghi di insulina lenta ed ultra-lenta presentano invece un profilo più piatto mimando sempre più il profilo insulinico basale di un soggetto sano. [14]

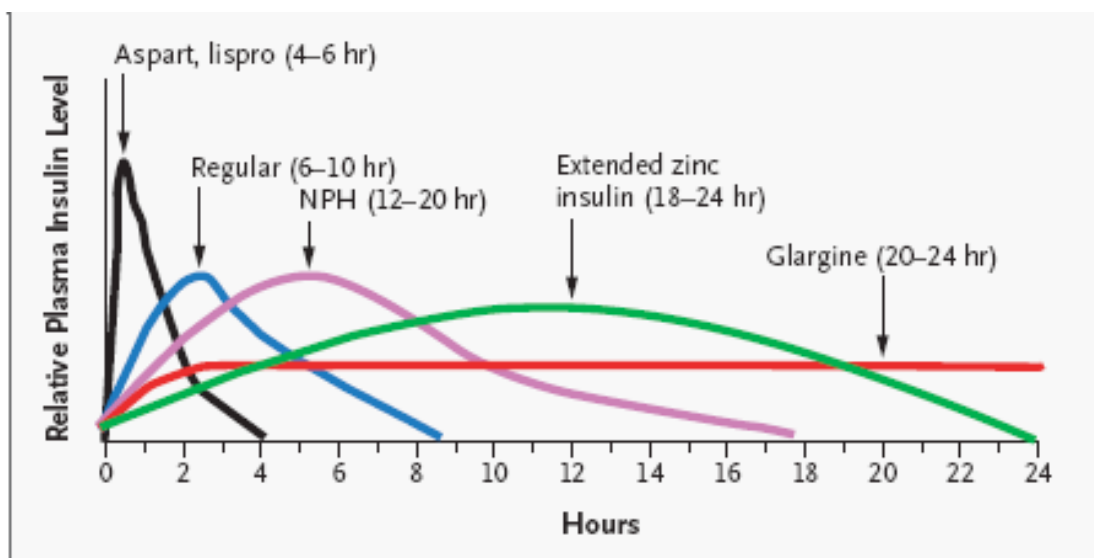


Figura 5: andamento della concentrazione plasmatica di diverse tipologie di insulina [7]

### 1.3.1 Analoghi di insulina ad azione ultrarapida: Faster-Aspart

Una nuova formulazione di un analogo di insulina ultrarapido, utilizzabile per boli pasto/correttivi e impiegabile in terapia MDI o in sistemi CSII, è stato recentemente sviluppato. Si tratta di una versione modificata dell'insulina Aspart denominata "Faster-Aspart", ottenuta effettuando una sostituzione di un amminoacido nella catena B. Nella posizione B28 è stata effettuata la sostituzione dell'amminoacido prolina con dell'acido aspartico, creando così una diversa tipologia di insulina Aspart ad azione più rapida.[8]

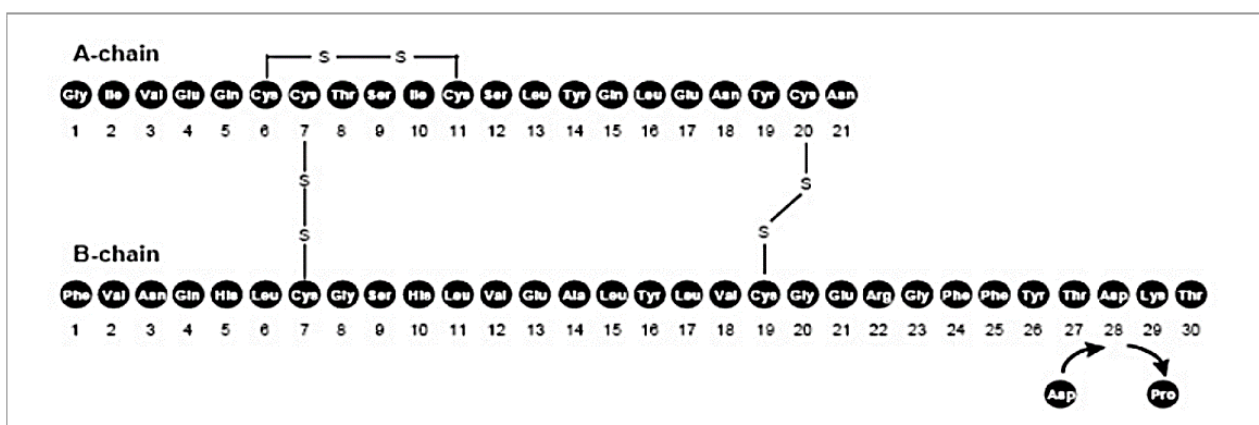


Figura 6: Struttura insulina Faster-Aspart [17]

In questa nuova formulazione sono presenti due eccipienti addizionali, L-arginina e acido nicotinico, i quali consentono un'azione più rapida di qualsiasi bolo di insulina.

La L-arginina agisce come agente stabilizzante, mentre l'acido nicotinico promuove un assorbimento iniziale accelerato a seguito della somministrazione del bolo [8]. La sicurezza dal punto di vista medico di questi eccipienti è comprovata dal loro inserimento nell' US FDA "inactive ingredient database", come prodotti inoculabili a concentrazioni più elevate di quelle utilizzate per la formulazione della Faster-Aspart [9].

Le proprietà farmacocinetiche (PK) dell'assorbimento sottocutaneo di insulina possono essere descritte attraverso esperimenti standardizzati di bolo sottocutaneo, misurando le AUC (Area Under Curve) dei tracciati relativi alla concentrazione plasmatica di insulina nel tempo, il tempo di comparsa (onset of appearance) e il  $t_{50\%C_{max}}$  (tempo alla metà della concentrazione massima).

Quello che si evince dalla letteratura è che l'insulina Faster-Aspart presenta valori AUC maggiori entro la prima ora e mezza post-iniezione, tempi di comparsa e un  $t_{50\%C_{max}}$  minori rispetto alla

Aspart, pur mantenendo AUC nelle 12 ore post-iniezione e valori di concentrazione massima simili (Figura 7). [14]

	Faster-acting insulin aspart (N = 51) LS mean (CV or s.e.m.)*	Insulin aspart (N = 51) LS mean (CV or s.e.m.)*	Treatment ratio (95% CI) faster-acting insulin aspart/insulin aspart
<b>Onset of insulin exposure, min</b>			
Onset of appearance	4.9 (0.45)*	11.2 (0.45)*	0.43 (0.36; 0.51)
t <sub>50%</sub> C <sub>max</sub>	20.7 (1.03)*	31.6 (1.03)*	0.65 (0.59; 0.72)
t <sub>max</sub>	62.9 (3.73)*	69.7 (3.73)*	0.90 (0.79; 1.03)
<b>Early insulin exposure, pmol × h/l</b>			
AUC <sub>0-15 min</sub>	14.0 (0.12)	3.1 (0.12)	4.53 (3.62; 5.66)
AUC <sub>0-30 min</sub>	59.9 (0.09)	29.2 (0.09)	2.05 (1.76; 2.38)
AUC <sub>0-1 h</sub>	196.5 (0.07)	153.4 (0.07)	1.28 (1.15; 1.43)
AUC <sub>0-1.5 h</sub>	328.8 (0.06)	295.4 (0.06)	1.11 (1.01; 1.22)
AUC <sub>0-2 h</sub>	441.9 (0.06)	424.5 (0.06)	1.04 (0.95; 1.14)
<b>Overall exposure</b>			
AUC <sub>0-12 h</sub> , pmol × h/l	755.7 (0.05)	786.9 (0.05)	0.96 (0.87; 1.06)
C <sub>max</sub> , pmol/l	318.5 (0.06)	324.4 (0.06)	0.98 (0.90; 1.07)

Figura 7: Valori relativi alla farmacocinetica di Aspart e Faster-Aspart da dataset 1 [14]

## 1.4 Obiettivo della tesi

L'obiettivo di questa tesi è di utilizzare un modello compartimentale relativo all'assorbimento sottocutaneo di insulina, sviluppato per analoghi rapidi in soggetti diabetici di tipo 1, per descrivere il processo di assorbimento di un nuovo analogo di insulina ultrarapida (Faster-Aspart) nel plasma dopo iniezione sottocutanea. In particolare, a partire da dati di letteratura, si vuole osservare se il modello sia capace di descrivere tali dati e in tal caso confrontare i parametri così ottenuti rispetto al corrispettivo analogo rapido di insulina (Aspart) negli stessi pazienti diabetici di tipo 1. Per fare ciò sono stati estratti da articoli scientifici presenti in letteratura, dati di esperimenti di confronto tra insulina Aspart e Faster-Aspart in soggetti diabetici di tipo 1.

Nel primo capitolo vengono analizzati gli aspetti chiave del diabete mellito e della terapia insulinica convenzionale, con particolare riferimento alle diverse tipologie di insulina impiegate. Vengono evidenziate le principali differenze tra l'insulina Aspart e Faster-Aspart dal punto di vista farmacocinetico. Nel secondo capitolo vengono presentati i due dataset di riferimento per questo confronto, estratti da articoli scientifici presenti in letteratura. Inoltre, viene presentato il modello compartimentale di assorbimento sottocutaneo utilizzato per descrivere i dati e le tecniche di stima parametrica impiegate per la stima dei parametri del modello. Nel terzo capitolo vengono riportati i risultati dell'analisi dei dati tramite modello ed effettuato un confronto tra i risultati del modello stesso e i dati forniti dagli articoli scientifici considerati.





# 2.Database & Metodi

In questo capitolo verranno riportati i database utilizzati, il modello compartimentale di assorbimento sottocutaneo di insulina rapida e le tecniche di stima parametrica utilizzate.

## 2.1 Database

I database oggetto di studio sono il risultato di due trial clinici differenti condotti su pazienti T1D tra i 18 e 64 anni. In entrambi gli studi sono state valutate le differenze farmacocinetiche e farmacodinamiche tra insulina Aspart e Faster-Aspart.[14][9]

Per entrambi i dataset i valori di concentrazione sono stati ricavati dai grafici (figure 8,9,10) in modo manuale, mediante l'impiego di griglie basate sui tempi di campionamento usati nei trial. Per valutare eventuali imprecisioni i dati ricavati sono stati in seguito graficati e messi a confronto con i grafici della letteratura.

### 2.1.1 Dataset 1 [14]

Lo studio è stato effettuato in doppio cieco, visionato e approvato dall'autorità locale per la salute (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte). Registrato in ClinicalTrial.gov (NCT01618188). Sono stati considerati uomini e donne di età compresa tra 18 e 64 anni, con T1D diagnosticato da almeno 12 mesi prima dell'ingresso nel trial, trattati con MDI o con infusione s.c. continua di insulina da più di 12 mesi.

Il trial comprende una visita di screening (1°), tre visite con somministrazione (2°-4°) e una visita di follow-up (5°). Lo screening è stato effettuato 2-21 giorni prima della 2° visita e il follow-up 2-21 giorni dopo l'ultima visita con somministrazione. Nelle visite con somministrazione i soggetti ricevono una singola dose di 0.2 U/kg di insulina Faster-Aspart o di insulina Aspart. Per ogni visita i soggetti si presentano a digiuno dalle ore 22:00 della sera precedente.

Il campionamento di insulina plasmatica per la misura della velocità di comparsa di insulina dopo il bolo consiste in: ogni 2 min per i primi 20 min, ogni 5 min tra i 20 e gli 80 min, ogni 10 min dagli 80 min a 2h, ogni 15 min dalle 2 alle 3h, ogni 30 min dalle 3 alle 4h, ad intervalli di 1h tra le 4 e le 8 ore e ogni 2h tra le 8 e le 12h.

Nello studio considerato [14] la valutazione della farmacocinetica e farmacodinamica è stata effettuata con un particolare focus sulle prime 2 ore dalla somministrazione dell'insulina. Analogamente in questo confronto sono state considerate solo le prime 2 ore (Fig. 8).

I profili medi di concentrazione di insulina plasmatica, dopo la somministrazione di insulina Faster-Aspart, presentano una comparsa anticipata rispetto all'analogo insulina Aspart (4.9 vs 11.2 min) e un minore  $t_{50\%C_{max}}$  (20.7 vs 31.6 min), riducendo quindi i tempi rispettivamente del 57% e del 35%.

[14]

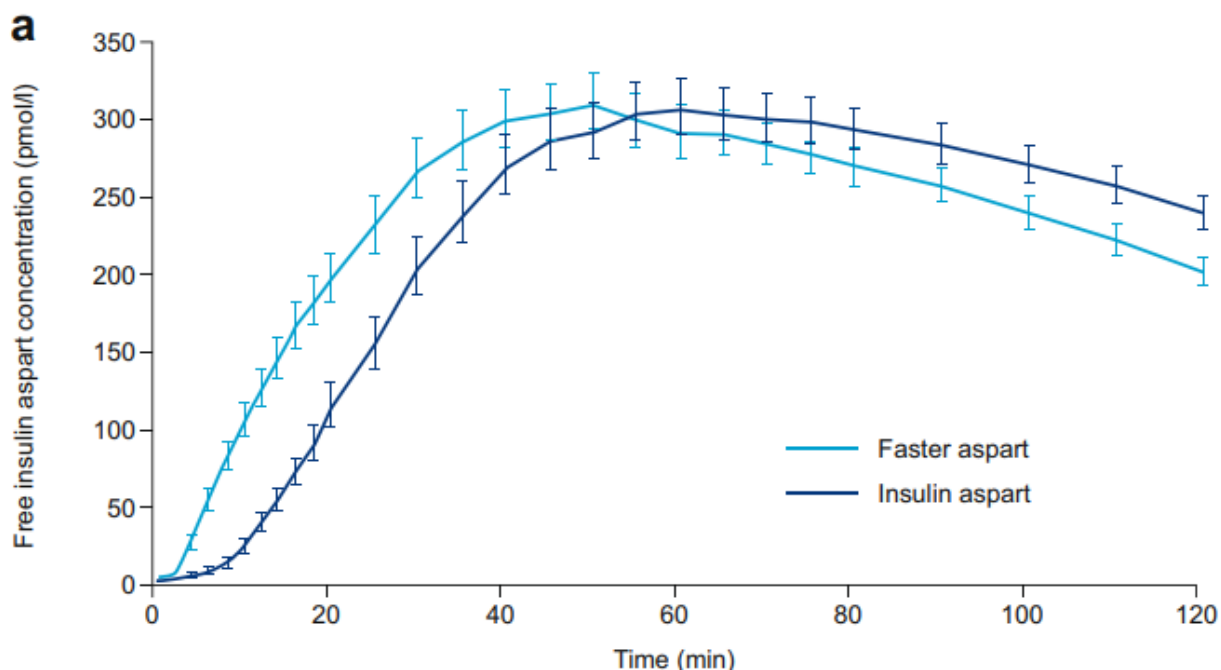


Figura 8: Profili di concentrazione plasmatica di insulina a seguito di una somministrazione di 0.2 U/Kg Aspart o Faster-Aspart. [14]

Time (min)	Aspart (pmol/l)	Faster-Aspart (pmol/l)
0	0	0
2	2	5
4	5	26
6	7	42
8	10	62.5
10	20	92
12	33	117
14	49	135
16	64	152
18	77	175
20	105	190
25	149	228
30	193	262
35	230	282
40	265	290
45	285	305
50	290	308
55	299	300
60	305	291
65	304	290
70	300	284
75	292	275
80	290	270
90	286	262
100	273	240
110	258	224
120	243	208

Tabella 1: Dati relativi alla concentrazione plasmatica di insulina a seguito di somministrazione a 0.2 U/Kg di Aspart o Faster-Aspart. Prelevati manualmente (esattezza limitata) da figura 8

## 2.1.2 Dataset 2 [9]

Lo studio è stato effettuato in doppio cieco, visionato e approvato da un comitato etico indipendente. Registrato in ClinicalTrials.gov (NCT02033239). Sono stati considerati uomini e donne di età compresa tra i 18 e i 64 anni con T1D diagnosticato da più di 12 mesi prima della partecipazione al trial, trattati per più di 12 mesi con MDI o con infusione s.c. continua di insulina. Il trial è stato suddiviso in 10 visite: una visita di screening, otto visite con somministrazione separate da un minimo di 3 fino a 15 giorni di periodo di sospensione (washout period) e una visita di follow up. Tutti i soggetti hanno ricevuto somministrazioni con i dosaggi diversi (0.1, 0.2 e 0.4 U/Kg) di Faster-Aspart e insulina Aspart. Per ogni visita con somministrazione i soggetti si presentavano a digiuno dalle ore 22:00 della sera precedente.

Il campionamento di insulina plasmatica per la misura della velocità di comparsa di insulina dopo il bolo consiste in: ogni 2 min per i primi 20 min, ogni 5 min tra i 20 e gli 80 min, ogni 10 min dagli 80 min a 2h, ogni 15 min dalle 2 alle 2.5h, successivamente ogni 3, 3.5, 4, 5.5, 7, 9 e 12h a seguito della dose.

I profili medi di concentrazione plasmatica per l'insulina Faster-Aspart hanno, per tutti i tre dosaggi, una comparsa anticipata rispetto all'analogo insulina Aspart, con il  $t_{50\%C_{max}}$  e la comparsa a livello plasmatico sempre più rapide per l'insulina Faster-Aspart.

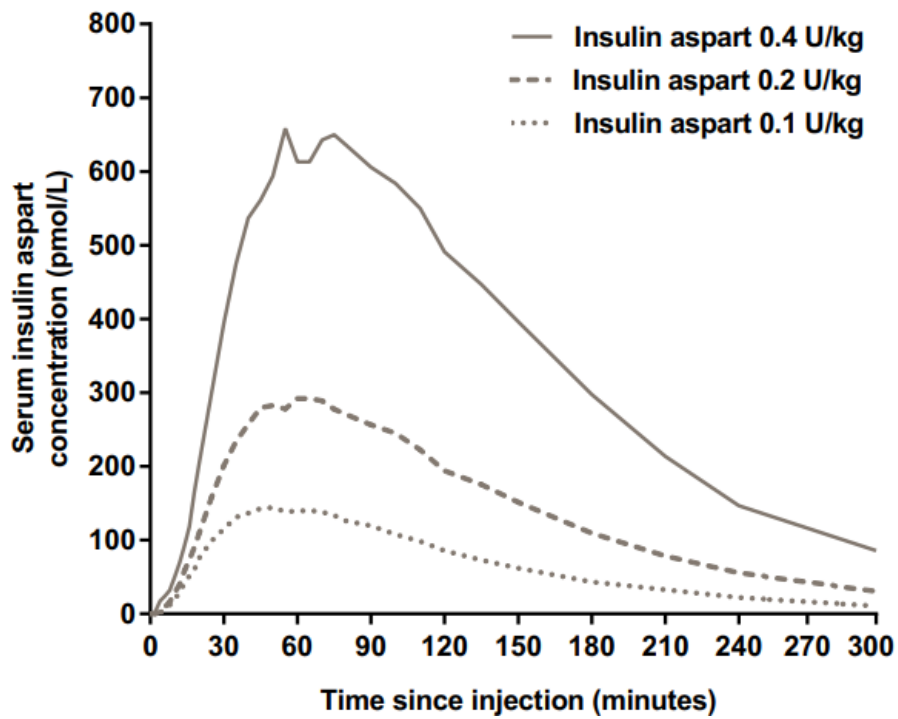


Figura 9: Profili di concentrazione plasmatica di insulina Aspart per tre diversi dosaggi in somministrazione [9]

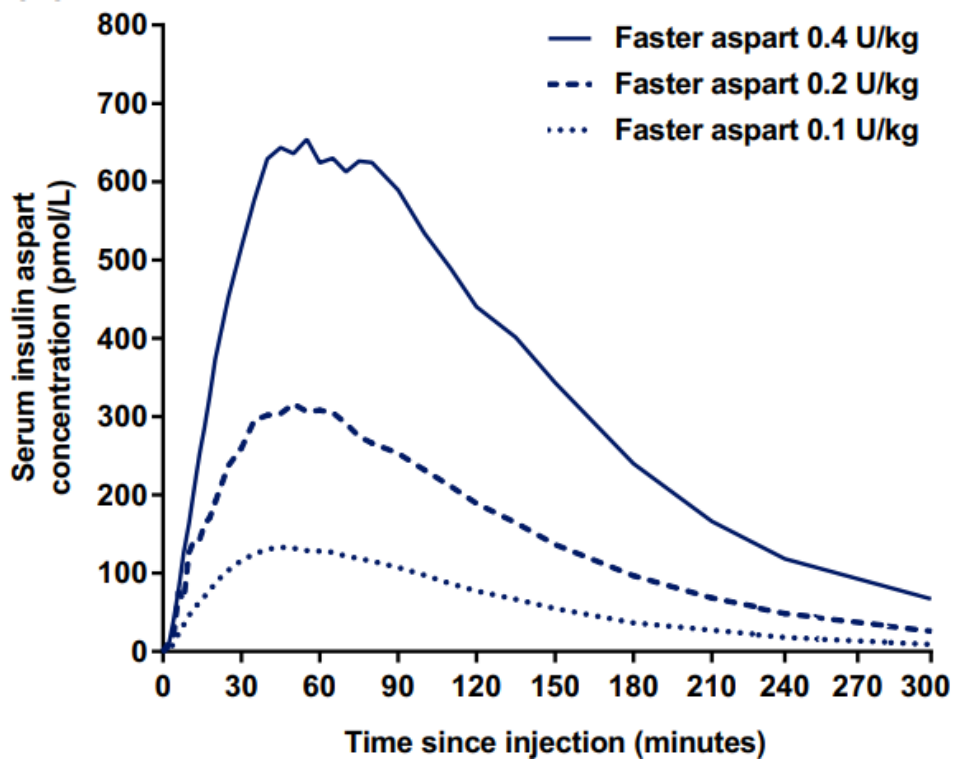


Figura 10: Profili di concentrazione plasmatica di insulina Faster-Aspart per tre diversi dosaggi in somministrazione [9]

Time (min)	Aspart (pmol/L)			Faster-Aspart (pmol/L)		
	0.1 U/kg	0.2 U/kg	0.4 U/kg	0.1 U/kg	0.2 U/kg	0.4 U/kg
0	0	0	0	0	0	0
2	1	2	10	2	10	10
4	2	5	20	6	15	49
6	5	10	25	20	75	80
8	10	15	40	30	70	125
10	17	25	55	45	130	170
12	27	32	70	52	137	210
14	37.5	50	90	62	145	260
16	50	70	122	67	152	290
18	60	78	160	77	168	325
20	73	98	200	87	178	375
25	95	150	295	102	225	440
30	112.5	200	390	115	258	520
35	130	235	470	123	290	570
40	135	253	545	128	302	625
45	140	272	560	133	301	645
50	144	276	590	131	312.5	647
55	136	271	665	128	310	660
60	137.5	290	620	127	310	630
65	139	289	615	125	305	645
70	135	280	648	121	280	623
75	130	272	655	117	270	642
80	124	269	646	113	262.5	640
90	117	253	619	106	249	595
100	107	245	585	96	230	540
110	97	221	549	86	210	485
120	85	193	490	75	189	438
135	75	180	450	70	165	400
150	60	150	400	56	145	345
180	46	110	300	35	99	240
210	30	75	210	25	70	170
240	15	50	150	15	50	120
300	10	35	80	7	25	75

Tabella 2: Dati relativi alla concentrazione plasmatica di insulina a seguito di 3 diverse somministrazioni in U/Kg di Aspart e Faster-Aspart. Prelevati manualmente (esattezza limitata) da figura 9 e figura 10.

## 2.2 Metodi

### 2.2.1 Modello di assorbimento sottocutaneo di insulina ad azione rapida

Il modello considerato per le stime riguardanti l'assorbimento sottocutaneo di insulina ad azione rapida è quello sviluppato da Schiavon et al. [10] nel 2018, associato ad un modello della cinetica dell'insulina nel plasma.

Il modello presenta un ritardo soggetto specifico ( $\tau$ ) nella comparsa dell'insulina nel primo compartimento. Dal primo compartimento l'insulina è parzialmente assorbita nel plasma con un tasso  $k_{a1}$  ( $\text{min}^{-1}$ ), l'insulina restante diffonde con un tasso  $k_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ) nel secondo compartimento per poi essere assorbita nel plasma con un tasso  $k_{a2}$  ( $\text{min}^{-1}$ ). [10]

Come precedentemente riportato, il modello bicompartimentale dell'assorbimento sottocutaneo è associato da un modello monocompartimentale della cinetica dell'insulina nel plasma (Figura 11), con  $V$  ( $\text{mL/kg}$ ) volume di distribuzione e  $k_e$  costante frazionaria di clearance ( $\text{min}^{-1}$ ).

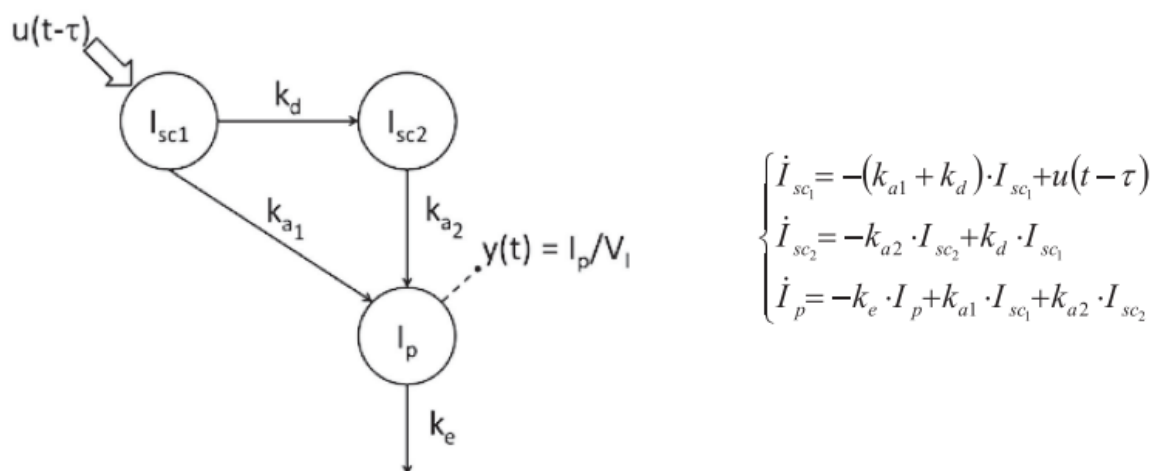


Figura 11: Modello compartimentale assorbimento sottocutaneo insulina (6 parametri) [10]

## 2.2.2 Stima parametrica

La stima dei parametri è possibile sfruttando le risposte del sistema ad un input definito. L'output osservabile è descritto in tempo continuo attraverso il modello come:

$$y(t) = g(t, p)$$

La funzione  $g(\cdot)$  dipende dalle equazioni costituenti il modello e il vettore  $p$  contiene i parametri sconosciuti. Nella pratica l'output misurato è a tempo discreto, le  $N$  misurazioni del segnale effettuate negli istanti di tempo  $\{t_1, \dots, t_N\}$  sono affette da rumore e da errore di misura.

Spesso l'errore è di natura additiva, perciò si può assumere che la misura  $k$ -esima si possa scrivere come:

$$Z_k = y(t_k) + v_k = g(t_k, p) + v_k \quad \{k = 1, 2, \dots, N\}$$

dove  $v_k$  è l'errore della  $k$ -esima misura.

L'equazione si può esprimere in forma matriciale, con  $\mathbf{z} = [z_1, \dots, z_N]^T$ , con

$$\mathbf{G}(p) = [g(t_1, p), \dots, g(t_N, p)]^T \text{ e } \mathbf{v} = [v_1, \dots, v_N]^T:$$

$$\mathbf{z} = \mathbf{y} + \mathbf{v} = \mathbf{G}(p) + \mathbf{v} \quad k = 1, \dots, N$$

Le assunzioni generali riguardo al rumore sono:

$$E[v_i] = 0 \quad \text{Gli errori hanno valor medio zero}$$

$$\text{Cov}[v_i, v_j] = 0 \text{ con } i \neq j \quad \text{Gli errori sono indipendenti}$$

$$\text{Var}[v_i] = \sigma_i^2 \quad \text{La varianza è nota}$$

La matrice di covarianza del vettore  $\mathbf{v}$  può essere definita come:

$$\sum_{\mathbf{v}} = E[\mathbf{v}\mathbf{v}^T] = \sigma^2 B$$

dove  $B$  è una matrice di dimensione  $N$  sempre nota. In particolare:

- $B = I_n$  se la varianza del rumore è costante e uguale a  $\sigma^2$
- $B = \text{diag}(\sigma_1^2, \dots, \sigma_N^2)$  se la varianza varia per ogni  $z_k$
- $B = \text{diag}(z_1^2, \dots, z_N^2)$  quando CV è costante e pari a  $\sigma$

Per il processo di stima parametrica si definisce il concetto di residuo o errore di predizione, ossia la distanza tra i dati e la predizione del modello:

$$r_k = e_k = z(t_k) - y(t_k)$$



Da cui è possibile ricavare la somma dei residui al quadrato (RSS)

$$RSS = \sum_{i=1}^N r_i^2 = \sum_{i=1}^N (z(t_i) - g(t_i, \mathbf{p}))^2$$

L'obiettivo nel processo di stima parametrica ai minimi quadrati è trovare il  $\mathbf{p}$  che minimizzi  $RSS(\mathbf{p})$ , chiamata anche funzione di costo e indicata con  $J(\mathbf{p})$ . È possibile, inoltre, attribuire un maggior peso a dati di maggiore interesse in modo che abbiano una incidenza più significativa sul risultato finale.

$$WRSS = \sum_{i=1}^N w_i r_i^2$$

Generalizzando il peso  $w_i$  può essere arbitrario, di fatto, a causa degli errori a cui possono essere soggetti i dati, per avere una aderenza del modello proporzionale all'affidabilità dei dati la scelta ottimale è  $w_i = 1/\sigma_i^2$  dove  $\sigma_i^2$  è la varianza del rumore associato alla misura i-esima.

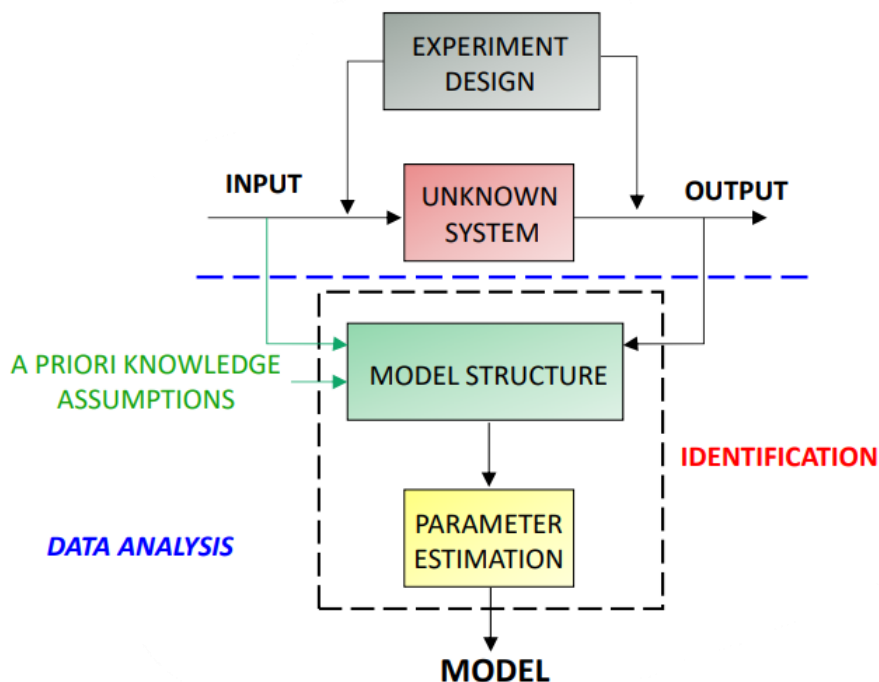


Figura 12: Rappresentazione della procedura di stima parametrica

Il problema della stima parametrica consiste nel determinare una stima  $\hat{\mathbf{p}}$  del vettore  $\mathbf{p}$  incognito a partire dalle misure  $\mathbf{z}$  e può essere affrontato con un approccio **Fisheriano** o **Bayesiano**. [18]

- **Metodo Fisheriano:** Il valore deterministico  $p$ , per il quale esiste un valore “vero”, è stimato usando solo i dati sperimentali. Considerando  $\mathbf{z} = \mathbf{y} + \mathbf{v} = \mathbf{G}(\mathbf{p}) + \mathbf{v}$  è possibile calcolare, in un dato istante di tempo, l’uscita del sistema in risposta a un dato input e ottenere il vettore  $\mathbf{G}(\mathbf{p})$ , chiamato *predizione del modello*.

Una valutazione della bontà del modello si può effettuare misurando il quadrato della norma di  $\mathbf{e}(\mathbf{p})$ :

$$J(\mathbf{p}) = [\mathbf{z} - \mathbf{G}(\mathbf{p})]^T \mathbf{B}^{-1} [\mathbf{z} - \mathbf{G}(\mathbf{p})]$$

$\mathbf{p}$  è un vettore incognito, lo si può ottenere attraverso la tecnica di stima ai minimi quadrati pesati (*Weighted Least Squares*), che fornisce un valore attraverso la minimizzazione di  $J(\mathbf{p})$ :

$$\hat{\mathbf{p}}_{WLS} = \arg \min_p J(\mathbf{p})$$

- **Metodo Bayesiano:** un valore deterministico  $\mathbf{p}$  non esiste ma è una realizzazione di una variabile aleatoria con una certa densità di probabilità (*Probability Density Function*)  $f_p(\mathbf{p})$ , la cui descrizione (nota) viene utilizzata nel processo di stima (informazione a priori) insieme ai dati sperimentali (informazioni a posteriori). Anche  $\mathbf{v}$  è una variabile aleatoria con una  $f_v(\mathbf{v})$ , di conseguenza lo è anche  $\mathbf{z}$  che dipende sia dal rumore  $\mathbf{v}$  sia dai parametri  $\mathbf{p}$ . È possibile calcolare, usando il teorema di Bayes, la densità di probabilità a posteriori di  $\mathbf{p}$ :

$$f_{p|z}(\mathbf{p}|z) = \frac{f_{z|p}(z|\mathbf{p})f_p(\mathbf{p})}{f_z(z)}$$

Dove  $f_z(\mathbf{z})$  è la densità di probabilità a priori del vettore delle misure  $\mathbf{z}$  e  $f_{z|p}(z|\mathbf{p})$  è la densità di probabilità di  $\mathbf{z}$  dato il vettore parametri  $\mathbf{p}$ . Un esempio di stimatore Bayesiano è lo stimatore Massimo a Posteriori MAP:

$$\hat{\mathbf{p}}_{MAP} = \arg \max_p f_{p|z}(\mathbf{p}|z)f_p(\mathbf{p})$$

Il metodo di Bayes per definizione peggiora il fit dei dati, migliorando però la precisione della stima dei parametri rispetto al metodo di Fisher. Bayes rappresenta un’ottima scelta in caso di scarsità di dati a disposizione o elevata complessità del modello.

Come nella stima fisheriana, anche in questo caso si può valutare la precisione delle stime, attraverso l’errore di stima  $\tilde{\mathbf{p}} = \mathbf{p} - \hat{\mathbf{p}}$ .

## 2.2.3 Identificazione del modello

Il modello è localmente identificabile, l'identificazione è possibile a partire dai valori di concentrazione di insulina plasmatica e informazioni a priori tramite lo stimatore Bayesian Maximum a Posteriori (MAP).

La funzione oggetto della minimizzazione è:

$$F(p) = \frac{1}{N+M} \left\{ \sum_{i=1}^N \left[ \frac{(y_i - G(\hat{p}, t_i))^2}{V_i(G(\hat{p}, t_i), y_i, \hat{v})} + \log[V_i(G(\hat{p}, t_i), y_i, \hat{v})] \right] + \sum_{k=1}^M \left[ \frac{(p_k - \mu_k)^2}{\sigma_k^2} + \log[\sigma_k^2] \right] \right\}$$

dove N e M sono rispettivamente il numero di campioni raccolti e parametri,  $y_i$  e  $t_i$  sono rispettivamente i campioni i-esimi e i tempi,  $p$  è il vettore dei parametri di modello,  $G(p, t_i)$  è il modello di predizione al tempo  $i$ ,  $\mu_k$  e  $\sigma_k$  sono la media e la standard deviation a priori del k-esimo parametro e  $V_i[G(p, t_i), y_i, v]$  è la misura che descrive la varianza dell'errore dell'i-esimo dato nel modello.

Le misurazioni dell'errore sono state assunte come indipendenti, Gaussiane, con valor medio nullo e deviazione standard nota con una costante di proporzionalità.

Perciò in questo caso la misura della varianza dell'errore del modello per il dato i-esimo si assume essere costante e a posteriori stimato dai dati come:

$$V_i(G(\hat{p}, t_i), y_i, \hat{v}) = \hat{v} \text{ with } \hat{v} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{(y_i - G(\hat{p}, t_i))^2}{V_i(G(\hat{p}, t_i), y_i, 1)}$$

Le condizioni iniziali dell'insulina sottocutanea nei compartimenti sono settate a zero, mentre le condizioni iniziali del compartimento del plasma sono settate al valore di concentrazione misurato prima dell'iniezione del bolo di insulina.

Un totale di 6 parametri è stato stimato ( $V_l, k_e, k_{a1}, k_d, k_{a2}, \tau$ ) assumendo che  $k_d \geq k_{a2}$ .

In alcune casistiche il modello può essere semplificato:

1.  $k_{a2} = k_d$  quando i due parametri sono pressoché identici (differenza relativa assoluta inferiore all'1%)
2.  $k_d = k_{a2} + k_{a1}$  quando la somma di  $k_{a2}$  e  $k_{a1}$  sono pressoché identiche a  $k_d$  (differenza relativa assoluta inferiore all'1%)
3.  $k_{a1} = 0$  and/or  $\tau = 0$  quando i rispettivi parametri sono pressoché nulli

L'identificazione parametrica è stata effettuata in MATLAB utilizzando la funzione *lsqnonlin*, che esegue una stima ai minimi quadrati di un sistema non lineare. Tale funzione richiede come argomenti la funzione costo da minimizzare, la stima iniziale di ogni parametro, gli estremi inferiori e superiori. Restituisce, oltre al vettore dei parametri stimati, anche il vettore residui e la matrice Jacobiana.

La procedura di identificazione utilizzata prevede:

- – la funzione *lsqnonlin* all'interno del file principale, che restituisce i valori corrispondenti al minimo della funzione costo finchè le variazioni di quest'ultima e dei parametri non scendono sotto una certa soglia;
- – il calcolo della funzione costo da minimizzare, definita in un file .m, che ad ogni ciclo assegna i valori ai parametri, risolve le equazioni differenziali del modello e calcola il valore della funzione costo;
- – la funzione *ode45* che risolve le equazioni differenziali del modello e che riceve come argomento il file .m nel quale sono definite.

# 3. Risultati

In questa tesi, il modello bicompartimentale in precedenza analizzato [10] è stato applicato ai 2 database nei casi di somministrazione di insulina Aspart e Faster-Aspart.

Effettuata la stima parametrica descritta nel paragrafo 2.2 sono stati confrontati i parametri stimati per tutte le casistiche, valutando la capacità del modello di descrivere la cinetica di assorbimento dell'insulina Faster-Aspart.

Ricavati i parametri nei due casi per entrambi i database è stata effettuata un'analisi statistica per valutare se e quali parametri sono significativamente differenti tra le due insuline. Il test, effettuato attraverso il programma Excel, restituisce una probabilità  $p$ . Nello specifico se tale probabilità è minore di 0.05, significa che la probabilità che la differenza tra le due medie sia dovuta al caso è minore del 5%. In questo caso tale differenza viene classificata come significativa.

## 3.1 Identificazione del modello

In questa sezione, il modello è stato identificato su entrambi i database secondo le metodologies specifiche riportate sezione 2.2.3. Di seguito vengono riportati i dati vs. predizione del modello e i parametri stimati per insulina Faster-Aspart e Aspart estratti dai Database 1 e 2.

### 3.1.1 Database 1

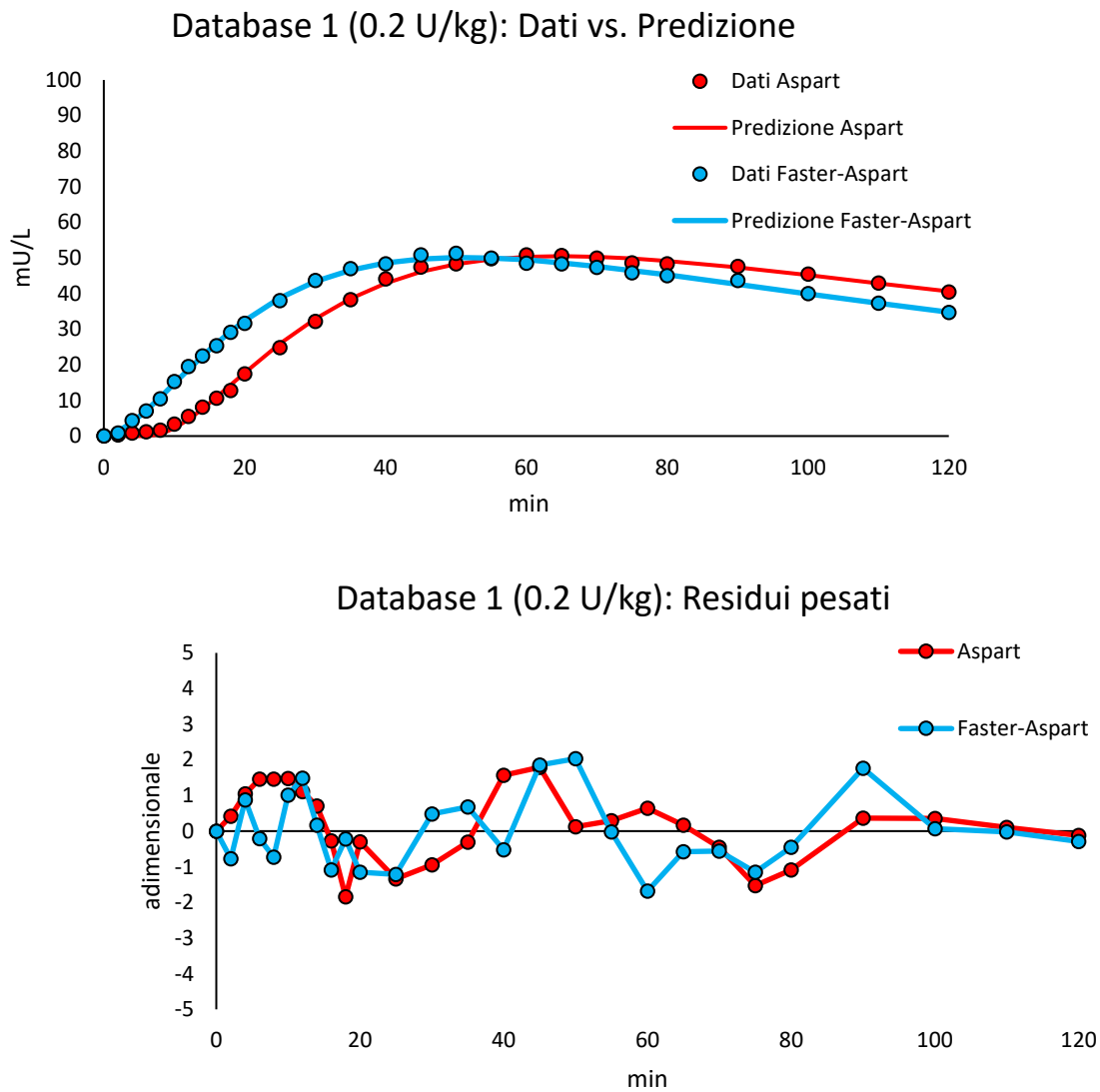


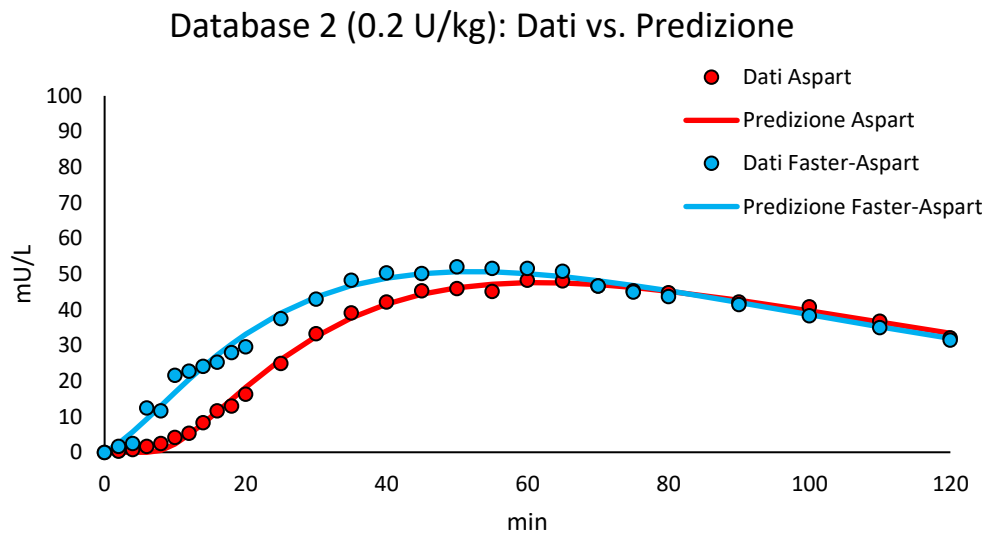
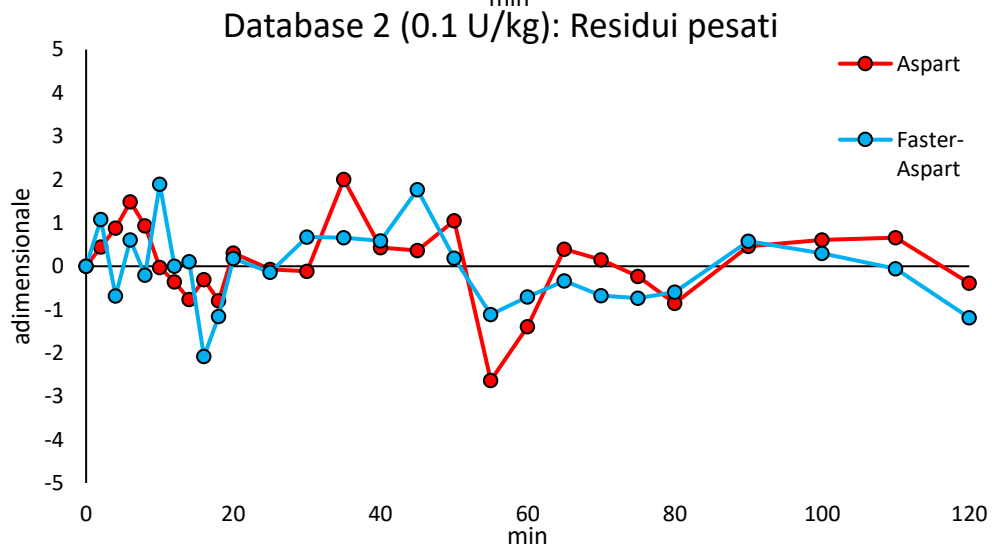
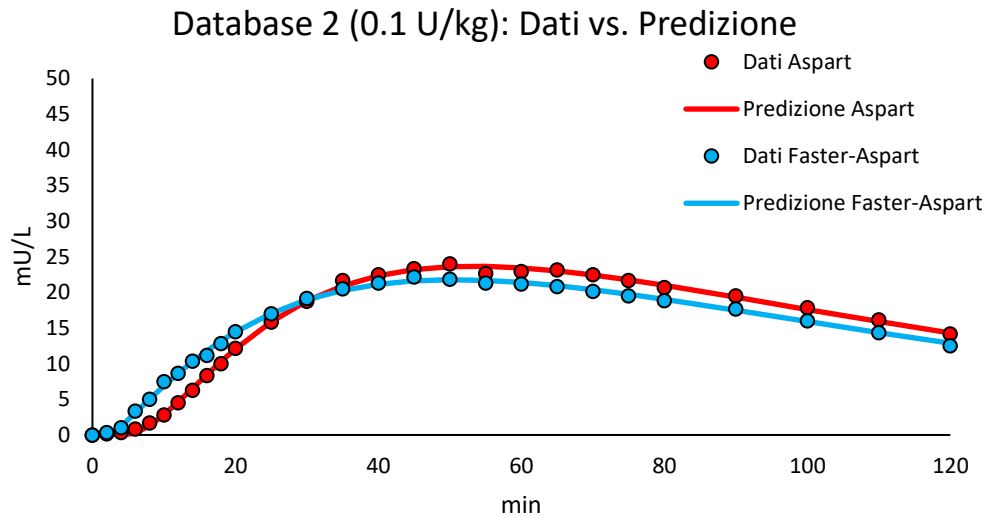
Figura 13: Stime di modello e residui pesati per insulina Aspart e Faster-Aspart, dati 1° dataset [14]

	Aspart		Faster-Aspart	
	Parametri	CV	Parametri	CV
V	0,161	12	0,158	10
ke	0,112	15	0,133	12
ka2	0,00616	14	0,00705	7
ka1	0	NaN	0	68
kd	0,051	16	0,056	9
$\tau$	6,341	6	0	NaN

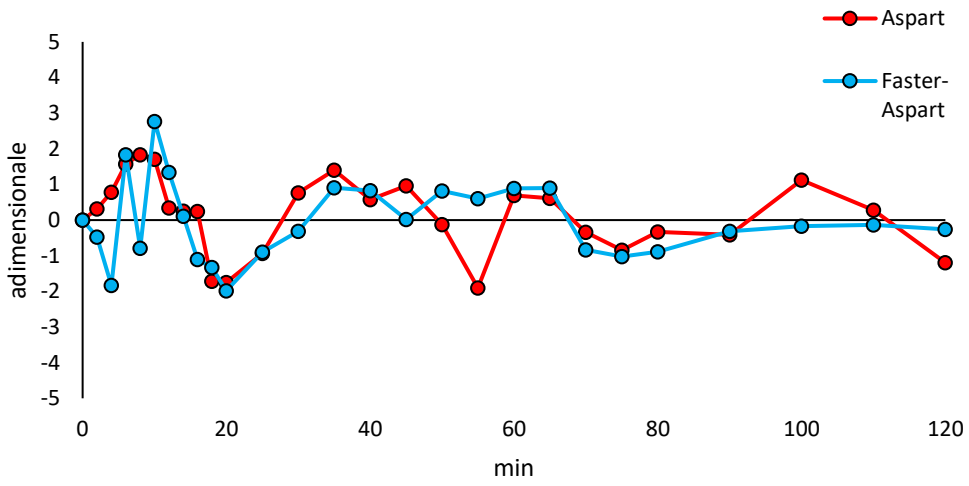
Tabella 4: Parametri stimati dal modello e relativi coefficienti di variazione (CV) per insulina Aspart e Faster-Aspart, 1° dataset [14]

### 3.1.2 Database 2

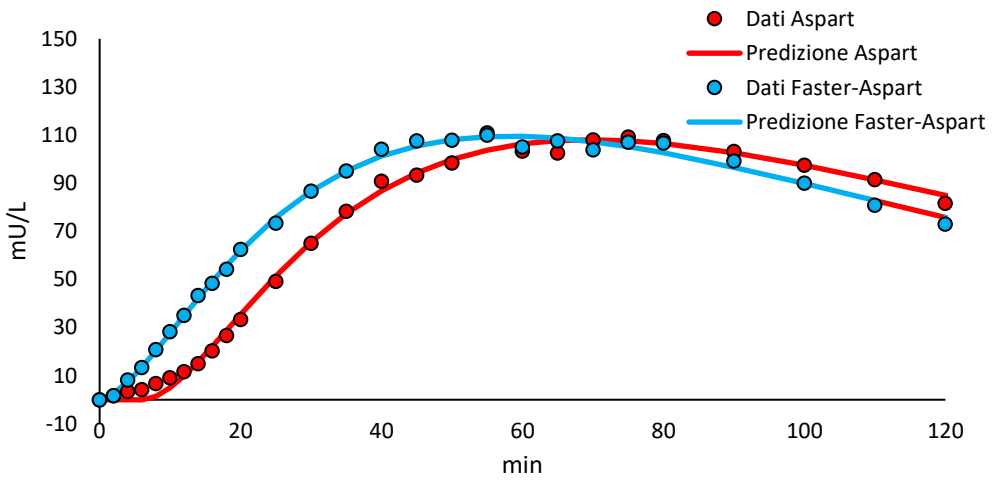
14: Stime di modello e residui pesati per insulina Aspart e Faster-Aspart dosaggi 0.1, 0.2, 0.4 U/Kg, dati 2° dataset (vedi anche pagine a seguire), 2° dataset[9]



Database 2 (0.2 U/kg): Residui pesati



Database 2 (0.4 U/kg): Dati vs. Predizione



Database 2 (0.4 U/kg): Residui pesati

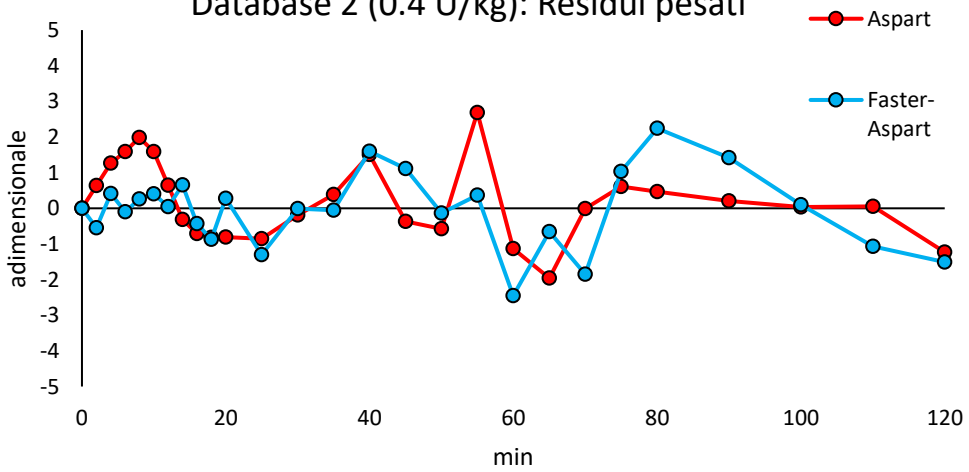


Figura 14



	Aspart					
	0,1 U/Kg		0,2 U/Kg		0,4 U/Kg	
	Parametri	CV	Parametri	CV	Parametri	CV
V	0,178	9	0,177	10	0,163	11
ke	0,171	9	0,154	10	0,137	11
ka2	0,012	4	0,011	6	0,012	9
ka1	0	NaN	0	NaN	0	NaN
kd	0,042	6	0,036	8	0,027	11
$\tau$	4,539	7	6,352	7	5,930	9

Tabella 5: Parametri stimati dal modello e relativi coefficienti di variazione (CV) per insulina Aspart, 2° dataset[9]

	Faster-Aspart					
	0,1 U/Kg		0,2 U/Kg		0,4 U/Kg	
	Parametri	CV	Parametri	CV	Parametri	CV
V	0,185	10	0,168	11	0,159	10
ke	0,179	10	0,157	11	0,147	10
ka2	0,012	5	0,011	9	0,012	6
ka1	0,002	20	0,001	34	0	61
kd	0,034	6	0,036	12	0,030	7
$\tau$	2,720	15	0	NaN	0	NaN

Tabella 6: Parametri stimati dal modello e relativi coefficienti di variazione (CV) per insulina Faster-Aspart, 2° dataset[9]

## 3.2 Analisi Statistica

È stata eseguita un'analisi statistica mediante test t-Student accoppiato tra tutti i parametri stimati da dati Aspart vs. Faster-Aspart provenienti da entrambi i database.

Parametro	Media (SD)		T-TEST (p-value)
	Aspart	Faster-Aspart	
v	0,1695 (0,0091)	0,1673 (0,0128)	0,56
ke	0,1435 (0,0253)	0,1543 (0,0194)	0,06
ka2	0,0102 (0,0027)	0,0102 (0,0021)	0,91
ka1	0 (0)	0,00074 (0,00071)	0,12
kd	0,0388 (0,0103)	0,039 (0,0118)	0,95
$\tau$	5,7906 (0,8569)	0,6798 (1,3597)	0,018

Tabella 7: Media (SD) e analisi statistica (T-test accoppiato) tra i parametri stimati dal modello per insulina Aspart e Faster-Aspart ( $p < 0.05$  è considerato statisticamente significativo).

## 4. Conclusioni

Lo sviluppo di nuovi analoghi di insulina che meglio si adattino a mimare il processo fisiologico di un individuo sano è uno dei punti fondamentali della ricerca contro il diabete. Le sostanziali differenze farmacocinetiche tra le diverse soluzioni inoculabili comportano la necessità di effettuare studi mirati per delinearne la cinetica e la dinamica dell'interazione con l'organismo biologico umano, così da massimizzare l'efficacia dei piani terapeutici per pazienti diabetici.

Sono stati considerati per questo studio due database relativi alle concentrazioni di insulina plasmatica provenienti da due trial clinici differenti, condotti su pazienti tra i 18 e i 64 anni affetti da T1D ai quali sono state somministrate insulina Aspart e Faster-Aspart.

I dati raccolti sono stati elaborati sulla base del modello farmacocinetico sviluppato da Schiavon et al. [10], permettendo la stima dei parametri del modello e l'individuazione di quali di questi differiscano tra le due insuline.

In generale, il modello sviluppato per l'assorbimento sottocutaneo di insulina rapida è in grado di descrivere la cinetica dell'analogo ultrarapido "Faster-Aspart", producendo profili sovrapponibili ai dati ricavati manualmente dagli articoli in letteratura. A conferma di ciò i residui pesati risultano essere sufficientemente bianchi e con ampiezza confrontabile con la regione  $\pm 1$ .

Come riportato in Tabella 6, il parametro  $\tau$ , relativo alla comparsa di insulina nel primo compartimento sottocutaneo, risulta essere significativamente minore con Faster-Aspart vs. Aspart, mentre rimanenti parametri risultano essere simili tra loro.

Un particolare degno di nota riguarda il parametro  $ka_1$ , ossia l'assorbimento diretto dal primo compartimento sottocutaneo al plasma: esso non risulta identificabile per tutti i soggetti con Aspart, poiché molto prossimo a zero, mentre si riesce a stimare con precisione nel caso di Faster-Aspart. Ciò è indicatore di una maggior velocità di assorbimento di Faster-Aspart vs. Aspart, ma la non identificabilità di questo parametro nel caso Aspart potrebbe aver contribuito, insieme al limitato numero di soggetti, alla non significatività tra le due popolazioni.

Questa analisi preliminare permette di poter meglio comprendere, sfruttando un modello semi-meccanicistico, le differenze nell'assorbimento sottocutaneo tra le due tipologie di insulina. Questi risultati possono essere rilevanti nello sviluppo e affinamento delle tecniche terapeutiche per soggetti affetti da diabete mellito.



# Bibliografia

- [1] D. U. Silverthorn, *“Fisiologia umana un approccio integrato”*, Pearson Italia, Milano, 2017
- [2] *Terapia insulinica*, [www.siditalia.it](http://www.siditalia.it)
- [3] Disturbi ormonali e metabolici, [www.msmanuals.com](http://www.msmanuals.com), versione pazienti
- [4] *“10th Italian diabete & obesity barometer report”*, Ibdo foundation, 2017
- [5] A. Tiengo, D. Bruttomesso, *“Trattamento del diabete di tipo 1”*, Area editoriale del ministero della salute.
- [6] S. Malik Faisal et al., *“Insulin therapy in Children and adolescents with Type 1 Diabetes”*, 2014
- [7] I.B. Hirsch, *“Insulin analogues”*, N Engl J Med, 352(2): 174-183, 2005
- [8] Davis et al., *“Faster insulin aspart: a new bolus option for diabetes mellitus”*, 2018
- [9] Heise et al., *“Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of FasterActing Insulin Aspart versus Insulin Aspart Across a Clinically Relevant Dose Range in Subjects with Type 1 Diabetes Mellitus”*, 2016
- [10] Schiavon et al., *“Modeling Subcutaneous Absorption of Fast-Acting Insulin in Type 1 Diabetes”*, 2018
- [11] C. Dalla Man et al., *“The UVA/Padova type 1 diabetes simulator: New features,” J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 8, no. 1, pp. 26–34, 2014.
- [12] M. E. Wilinska et al., *“Insulin kinetics in type-1 diabetes: Continuous and bolus delivery of rapid acting insulin,” IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 52, no. 1, pp. 3–12, Jan. 2005.
- [13] D. Lv et al., *“Pharmacokinetic model of the transport of fast-acting insulin from the subcutaneous and intradermal spaces to blood”*, J. Diabetes Sci. Technol., vol. 9, no. 5, pp. 831– 840, 2015.
- [14] Heise et al., *“Faster-acting insulin aspart: earlier onset of appearance and greater early pharmacokinetic and pharmacodynamic effects than insulin aspart”*, 2015
- [15] G. B. Bolli, *“Endocrinologia e Metabolismo”*, Sezione Medicina interna, Dipartimento Medicina interna, Università di Perugia.
- [16] Getting an Insulin Pump, [www.diabetes.co.uk](http://www.diabetes.co.uk)

- [17] *globalrph.com*
- [18] P. Magni and G. Sparacino, "*Parameter Estimation*", Modelling methodology for physiology and medicine, 2014.
- [19] Confrontare due medie: il test t di student, [www.quadernodiepidemiologia.it](http://www.quadernodiepidemiologia.it)
- [20] *italian.diabetesinsulinpen.com*