



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»

***In vitro και ex vivo εκτίμηση της συμπεριφοράς λιπόφιλων
φαρμάκων στον ανώτερο γαστρεντερικό αυλό***

Χριστίνα Κωσταντίνη

A.M. 160406

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2018



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»

***In vitro και ex vivo εκτίμηση της συμπεριφοράς λιπόφιλων
φαρμάκων στον ανώτερο γαστρεντερικό αυλό***

Χριστίνα Κωσταντίνη
Α.Μ. 160406
Φαρμακοποιός

Αθήνα 2018

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ρέππας Χρήστος, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Βαλσαμή Γεωργία, Αναπ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Συμιλλίδου Μοίρα, Αναπ.Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (επιβλέπουσα)

Στη μητέρα μου, Νατάσα...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης «Βιομηχανική Φαρμακευτική» υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Μοίρας Συμιλλίδου, στην οποία οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ανάθεση του θέματος και το ενδιαφέρον και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Χρήστο Ρέππα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο καθώς και την πολύτιμη στήριξή του.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Γεωργία Βαλσαμή, που ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, συμμετείχε στη τελική διαμόρφωση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρία Βερτζώνη για την αμέριστη συμπαράστασή της, επιστημονική και ψυχολογική, και την συνεχή βοήθειά της.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω και τις συναδέλφους Σάρα, Χριστίνα και Μαρίνα, για την αρμονική συνεργασία και το όμορφο και φιλικό κλίμα στο εργαστήριο.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την εταιρεία Merck & Co. για την οικονομική υποστήριξη της παρούσας εργασίας και στον Διευθυντή του Γαστρεντερολογικού Τμήματος του Νοσοκομείου Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός για την πραγματοποίηση της κλινικής μελέτης.

Η συγκεκριμένη εργασία δεν θα μπορούσε να είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την στήριξη και την αγάπη των δικών μου ανθρώπων Αθηνά, Ελευθερία, Διαμαντή, Αποστόλη και Πασχαλίνα καθώς και του πατέρα μου Γιώργου, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στη μητέρα μου, Νατάσα. Τα λόγια της και η αγάπη της θα αποτελούν για πάντα το στήριγμα και τη δύναμή μου.

Ιούνιος 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχοι: (i) Σχεδιασμός και εφαρμογή της διάταξης μ BioGIT, που αποτελεί σμίκρυνση της διάταξης BioGIT, και σύγκριση της λειτουργίας της με την αρχική διάταξη. (ii) Χρήση της διάταξης BioGIT για την *in vitro* εκτίμηση συνολικών και διαλυμένων στον ανώτερο εντερικό αυλό ποσοτήτων στερεών διασπορών δύο λιπόφιλων φαρμάκων (δραστική ουσία A και δραστική ουσία B) ανά όγκο. (iii) *In vitro* εφαρμογή μίας νέας μεθοδολογίας μη-συνεχούς μεταφοράς για την *ex vivo* εκτίμηση της ενδοαυλικής συμπεριφοράς προϊόντων λιπόφιλων φαρμάκων (“20-30 min one-step”) [τοποθετώντας στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα αναρροφηθέντα κατά τη διαπεπτική περίοδο εντερικά υγρά (HIF_{fasted})] και σύγκριση με την *in vitro* εκτίμηση της ενδοαυλικής μεταφοράς (τοποθετώντας στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II). (iv) Αξιολόγηση της κατανομής μεγέθους σωματιδίων της δραστικής ουσίας B σε δείγματα που λαμβάνονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε πειράματα που πραγματοποιούνται με τις διατάξεις BioGIT και “20-30 min one-step”.

Πειραματικό μέρος: Για την σύγκριση της λειτουργίας της διάταξης μ BioGIT με την αρχική διάταξη (BioGIT) πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τρεις δραστικές ουσίες (διάλυμα ρανιτιδίνης, διάλυμα κετοконаζόλης και εμπορικά διαθέσιμα δισκία πιογλιταζόνης) και στις δύο διατάξεις και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματά τους. Η σύγκριση των διατάξεων BioGIT- μ BioGIT έγινε με υπολογισμό της % μέσης σχετικής διαφοράς ποσότητας φαρμάκων ανά όγκο περιεχομένων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα (% MRD), τόσο για την συνολική όσο και για την διαλυμένη ποσότητα φαρμάκου, καθώς και με δείκτες άμεσης σύγκρισης καμπυλών ($f_{1,area}$, ξ_1 και ξ_2). Τα πειράματα με την διάταξη BioGIT για τα δύο προϊόντα στερεών διασπορών (δραστικές ουσίες A και B) πραγματοποιήθηκαν σε δύο δόσεις για την κάθε δραστική ουσία (μία χαμηλή και μία υψηλή) και αξιολογήθηκε η διαφορά των δεδομένων μεταξύ των δύο δόσεων. Για τη νέα μεθοδολογία μη-συνεχούς μεταφοράς ως χρονικό “παράθυρο” μελέτης επιλέχθηκε αυτό των 20-30 min. Συγκρίθηκαν τόσο οι συνολικές και διαλυμένες ποσότητες ανά όγκο όσο και το κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα για κάθε ουσία σε FaSSIF και σε HIF_{fasted} . Τέλος, η αξιολόγηση της κατανομής μεγέθους σωματιδίων για την δραστική

ουσία B έγινε μέσω διαδοχικών διηθήσεων των δειγμάτων μέσω ηθμών μεγέθους πόρων 1 μm , 0,45 μm και 0,1 μm και υπολογίστηκε το ποσοστό σωματιδίων σε κάθε τάξη μεγέθους (>1 μm , 1-0,45 μm , 0,45-0,1 μm και <0,1 μm). Έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων τόσο μεταξύ των δύο διατάξεων, BioGIT και “20-30 min one-step”, όσο και μεταξύ των δύο μέσων, FaSSIF και HIF_{fasted}, με τη διάταξη “20-30 min one-step”.

Αποτελέσματα: Η σύγκριση των διατάξεων BioGIT και μBioGIT έδειξε ότι το % MRD και για τις τρεις εξεταζόμενες ουσίες ήταν < 10% για όλα τα σημεία, εκτός από το δείγμα των πέντε λεπτών για την ολική ποσότητα κετοκοναζόλης (15,33 %) και την ολική και διαλυμένη ποσότητα πιουλιταζόνης (25,95 % και 22,00 % αντίστοιχα). Οι δείκτες άμεσης σύγκρισης καμπυλών δεν έδειξαν διαφορά μεταξύ των ποσοτήτων φαρμάκου στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα των δύο διατάξεων. Τα πειράματα με την διάταξη BioGIT για τις χαμηλές δόσεις και των δύο στερεών διασπορών έδειξαν ότι όλη η χορηγούμενη δόση βρίσκεται εν διαλύσει καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος. Για την υψηλή δόση της δραστικής ουσίας A παρατηρήθηκαν υψηλά υπέρκορες συγκεντρώσεις καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ για την δραστική ουσία B οι συγκεντρώσεις ήταν υπέρκορες σε μία σχεδόν σταθερή τιμή ($\approx 25 \mu\text{g/ml}$) λίγο μεγαλύτερη της διαλυτότητας κορεσμού της ($\approx 15 \mu\text{g/ml}$). Κατά την σύγκριση της συμπεριφοράς των λιπόφιλων φαρμάκων σε περιβάλλον FaSSIF και HIF_{fasted} στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, δεν βρέθηκε να υπάρχει μία σαφής τάση, ίδια, για όλα τα φάρμακα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοτήτων του φαρμάκου ανά όγκο στα δύο μέσα. Όσον αφορά την αξιολόγηση του μεγέθους σωματιδίων της δραστικής ουσίας B με την διάταξη BioGIT παρατηρείται αλλαγή της κατανομής μεγέθους σωματιδίων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στην διάταξη BioGIT τα σωματίδια κυμαίνονται σε μεγαλύτερες τάξεις μεγέθους απ’ ότι στην διάταξη “20-30 min one-step”. Τέλος, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην κατανομή των μεγεθών σωματιδίων στα δύο μέσα, FaSSIF και HIF_{fasted}, δεν ήταν προς την ίδια κατεύθυνση για τις δύο δόσεις της δραστικής ουσίας B που μελετήθηκαν.

Συμπεράσματα: Από την σύγκριση των διατάξεων BioGIT και μBioGIT , προκύπτει ότι και οι δύο μεθοδολογίες είναι ισοδύναμες και το ίδιο αποτελεσματικές για την μελέτη της ενδοαυλικής συμπεριφοράς ασθενών βάσεων. Οι στερεές διασπορές των

δραστικών ουσιών A και B είναι ικανές για διατήρηση υπέρκορων συγκεντρώσεων καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Δεν φαίνεται να υπάρχει μεγάλη και συστηματική διαφοροποίηση της συμπεριφοράς των φαρμάκων που μελετήθηκαν στα δύο μέσα, FaSSIF και HIF_{fasted}. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο μέγεθος των σωματιδίων μεταξύ FaSSIF και HIF_{fasted} πιθανώς να σχετίζονται με παράγοντες που διαφοροποιούν τη σύσταση των δύο μέσων και που η επίδρασή τους μπορεί να διαφοροποιείται με τη δόση του φαρμάκου.

Λέξεις-κλειδιά: BioGIT, μBioGIT, 20-30 min one-step, αναρροφηθέντα εντερικά υγρά, μελέτη διάλυσης, γαστρεντερική διάβαση, καθίζηση, άμορφες στερεές διασπορές, λιπόφιλα φάρμακα

ABSTRACT

Purpose: (i) To implement and evaluate the usefulness of a scaled down version of BioGIT, named μ BioGIT. (ii) To use the BioGIT system for predicting the luminal performance of amorphous solid dispersions of two lipophilic drugs (Compound A and Compound B). (iii) To implement a new non-continuous *in vitro* methodology (“20-30 min one-step”) for the *ex vivo* and *in vitro* evaluation of products of lipophilic drugs in upper gastrointestinal lumen using human intestinal aspirates (HIF_{fasted}) and FaSSIF Level II in the duodenal compartment respectively. (iv) To evaluate the particle size distribution of Compound B in the duodenal compartment during experiments with BioGIT and “20-30 min one-step” methodologies.

Methods: The evaluation of the μ BioGIT methodology was achieved by comparing total and dissolved amount per volume in the duodenal compartment of three model compounds (ranitidine solution, ketoconazole solution and pioglitazone tablets) with corresponding data collected with BioGIT. Two different dose levels (high and low) were examined with the BioGIT system for the two solid dispersions and the differences between the two doses were evaluated. For the “20-30 min one-step” methodology the time interval of 20-30 minutes was chosen for the experiments. The total amount per volume, the concentration and the solid fraction, estimated using pioglitazone tablets, Compound A and Compound B in gastric compartment and FaSSIF or HIF_{fasted} in the duodenal compartment, were evaluated. Finally, the particle size distribution of Compound B in the duodenal compartment was estimated with successive filtrations through filters with different pore sizes (1 μ m, 0,45 μ m and 0,1 μ m). The percentage of particles in each size range was estimated (>1 μ m, 1-0,45 μ m, 0,45-0,1 μ m και <0,1 μ m). Data collected using FaSSIF Level II and HIF_{fasted}, as well as the BioGIT and “20-30 min one-step” methodologies were evaluated.

Results: The mean relative difference (%MRD) for total and dissolved amount per volume for each compound was estimated for the comparison between BioGIT - μ BioGIT. In all cases, the %MRD was <10%, apart from the total amount of ketoconazole per volume at the sample of 5 minutes (15,33 %) and both total and dissolved amounts of pioglitazone per volume at the same sampling time point (25,95

% και 22,00 % respectively). The drug amount profiles in duodenal compartment of all three compounds between the two methodologies were also found to be similar when indices $f_{1,area}$, ξ_1 and ξ_2 were calculated. The BioGIT experiments for both solid dispersion compounds showed that the low doses were totally dissolved during the experiment. Regarding the high doses, pronounced supersaturation was observed in the case of Compound A, whereas a relatively constant value of supersaturated concentration, about 1,5 times greater than the solubility, was observed for Compound B. In the majority of cases examined no statistically significant differences in drug amount per volume were observed when FaSSIF or HIF_{fasted} was used in the duodenal compartment. The evaluation of the particle size distribution of Compound B, showed that during a BioGIT experiment the size of the particles changes (mainly < 0,45 μm at sampling time points of 5 and 45 minutes, > 0,45 μm during 15-35 minutes). Regarding the two methodologies, in BioGIT higher particle sizes were observed compared to the “20-30 min one-step” methodology. Differences in particle size distribution were observed between FaSSIF or HIF_{fasted} in the duodenal compartment of “20-30 min one-step” set-up. The trend of these differences was not the same for the two doses of Compound B.

Conclusions: The μ BioGIT methodology was found as effective as BioGIT for the evaluation of intraluminal performance of lipophilic compounds. High doses of both solid dispersions were found to supersaturate the contents of duodenal compartment throughout the experiment. Drug amounts per volume in FaSSIF and in HIF_{fasted} were not statistically different, indicating that FaSSIF is quite effective as simulated intraluminal media. Overall, there are no substantial differences in particle size distribution of Compound B between FaSSIF and HIF_{fasted}. Differences in particle size distribution between FaSSIF and HIF_{fasted} may be related to factors that differentiate the composition of the two media and their effect may vary with the dose of the drug.

Keywords: BioGIT, μ BioGIT, 20-30 min one-step, human intestinal aspirates, dissolution study, precipitation, gastrointestinal transfer, solid dispersions, lipophilic drugs.

Περιεχόμενα

A.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
A.1	Στερεές διασπορές	2
A.2	<i>In vitro</i> διατάξεις εκτίμησης ενδοαυλικής συμπεριφοράς	7
A.2.1	Διατάξεις μικρής κλίμακας.....	8
A.2.2	Διατάξεις μεγάλης κλίμακας	21
A.3	Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	31
A.3.1	Σχεδιασμός και εφαρμογή της διάταξης μ BioGIT – Σύγκριση με το BioGIT	31
A.3.2	<i>In vitro</i> εκτίμηση της συνολικής ποσότητας και της συγκέντρωσης στον ανώτερο εντερικό αυλό στερεών διασπορών των δραστικών ουσιών A και B με την διάταξη BioGIT.	31
A.3.3	Σύγκριση διάλυσης και μεταφοράς φαρμάκων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου όταν στο δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον <i>in vitro</i> περιέχεται FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II ή αναρροφηθέντα ανθρώπινα εντερικά υγρά (HIF _{fasted}).	32
A.3.4	Αξιολόγηση της κατανομής του μεγέθους σωματιδίων στα δείγματα από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα για την δραστική ουσία B σε πειράματα με τις διατάξεις BioGIT και “20-30 min one-step”.	33
B.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	35
B.1	Όργανα-Υλικά	35
B.2	Δραστικές ουσίες και φαρμακοτεχνικές μορφές	36
B.3	Αντιδραστήρια	36
B.4	Τεχνικές ανάλυσης.....	37
B.5	Κλινική μελέτη	37
B.5.1	Εθελοντές.....	38
B.5.2	Χαρακτηριστικά εθελοντών.....	39
B.5.3	Πρωτόκολλο	39
B.5.4	Χειρισμός αναρροφηθέντων δειγμάτων.....	42
B.6	Σχεδιασμός και εφαρμογή της διάταξης μ BioGIT – Σύγκριση με το BioGIT	42
B.6.1	Η διάταξη BioGIT (Biorelevant Gastrointestinal Transfer system)	42
B.6.2	Η διάταξη μ BioGIT	44
B.6.4	Φαρμακευτικά προϊόντα στο γαστρικό διαμέρισμα	49
B.6.5	Εκτέλεση πειραματικής διαδικασίας	50
B.7	<i>In vitro</i> μεθοδολογία για τη μελέτη της συμπεριφοράς λιπόφιλων φαρμάκων σε περιβάλλον μέσου προσομοίωσης δωδεκαδακτύλου (FaSSIF) και αναρροφηθέντων εντερικών υγρών (HIF _{fasted}) (“20-30 min one-step”).....	52
B.7.1	Σύσταση διαμερισμάτων νέας διάταξης.....	56

B.7.2	Εκτέλεση πειραματικής διαδικασίας	56
B.8	Ανάλυση πειραματικών δεδομένων.....	59
Γ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
Γ.1	Σύγκριση αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τις διατάξεις BioGIT και μBioGIT.	63
Γ.1.1	Διάλυμα ρανιτιδίνης	63
Γ.1.2	Διάλυμα κετοκοναζόλης	64
Γ.1.3	Δισκία πιογλιταζόνης	66
Γ.2	<i>In vitro</i> προσομοίωση των συγκεντρώσεων στον ανώτερο εντερικό αυλό με την διάταξη BioGIT για άμορφες στερεές διασπορές των δραστικών ουσιών Α και Β.	68
Γ.2.1	Προϊόν στερεής διασποράς δραστικής ουσίας Α	68
Γ.2.2	Προϊόν στερεής διασποράς δραστικής ουσίας Β	71
Γ.3	Σύγκριση συμπεριφοράς λιπόφιλων φαρμάκων σε περιβάλλον μέσου προσομοίωσης δωδεκαδακτύλου (FaSSiF) και αναρροφηθέντων εντερικών υγρών (HIF _{fasted}) με τη διάταξη “20-30 min one-step”	73
Γ.4	Αξιολόγηση μεγέθους σωματιδίων της δραστικής ουσίας Β στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε πειράματα με τις διατάξεις BioGIT και “20-30 min one-step”	83
Δ.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	91
Ε.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ		111
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....		113
Μέθοδοι προσδιορισμού δραστικών συστατικών και χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς		113
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....		127
Αντίγραφα αδειών κλινικής μελέτης, δήλωσης συγκατάθεσης και ερωτηματολογίου εθελοντών		127
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.....		149
Αντίγραφα ακτινοσκοπικών απεικονίσεων για κάθε εθελοντή.....		149
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4.....		153
Φωτογραφίες δειγμάτων		153
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5.....		157
Σημασία του όγκου του υγρού μέσου διάλυσης στο γαστρικό διαμέρισμα.....		157
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6.....		163
Πρωτογενή δεδομένα δειγμάτων που συλλέχθηκαν από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα των διατάξεων BioGIT και μBioGIT		163
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7		175
Έλεγχος προσρόφησης ηθμών		175

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8.....	179
Προκαταρκτικά πειράματα για βελτιστοποίηση χειρισμού δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα	179
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9.....	195
Μελέτη χρόνου εξισορρόπησης διαλυτότητας.....	195
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10.....	199
Πρωτογενή δεδομένα δειγμάτων που συλλέχθηκαν από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” στα 25 λεπτά	199
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11.....	205
Πρωτογενή δεδομένα από τον έλεγχο κατανομής μεγέθους σωματιδίων για την ουσία δραστική ουσία Β	205

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η από του στόματος χορήγηση (per os) φαρμάκων αποτελεί μία από τις συνηθέστερες και ευκολότερες οδούς λήψης φαρμάκων (Morishita & Peppas, 2006). Όμως, η διαδικασία απορρόφησης μετά από per os χορήγηση φαρμακευτικών προϊόντων είναι αρκετά πολύπλοκη και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Χαρακτηριστικά τόσο της ίδιας της δραστικής ουσίας όσο και του χρησιμοποιούμενου φαρμακευτικού προϊόντος καθώς και η φυσιολογία και το περιβάλλον του γαστρεντερικού αυλού μπορούν να είναι καθοριστικής σημασίας για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και την ασφάλεια του ασθενή. Το μοριακό βάρος, ο βαθμός ιονισμού, ο ρυθμός διάλυσης, η ταχύτητα καθίζησης, οι ρυθμοί γαστρικής κένωσης, το ιξώδες των ενδοαυλικών περιεχομένων, το pH, η συγκέντρωση χολικών αλάτων και φωσφολιπιδίων και η ενδοαυλική αποικοδόμηση αποτελούν ενδεικτικά μερικούς από αυτούς τους παράγοντες (Abuhelwa et al., 2017).

Πιθανός ενδοαυλικός υπερκορεσμός ή καθίζηση της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας (Active Pharmaceutical Ingredient- API), είναι υψίστης σημασίας για την έκταση απορρόφησής της, και κατ' επέκταση τη βιοδιαθεσιμότητά της. Ειδικά στις περιπτώσεις λιπόφιλων μορίων με ασθενείς βασικές ιδιότητες (τα οποία αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των per os χορηγούμενων φαρμάκων) και προϊόντων με αυξημένες δυνατότητες (bio-enabling products).

Καθώς κατά μήκος του γαστρεντερικού αυλού οι φυσιολογικές τιμές pH μεταβάλλονται (στόμαχος $\approx$ 1-2, δωδεκαδάκτυλο $\approx$ 6,5, νήστιδα $\approx$ 7) (Abuhelwa et al., 2016), η διαλυτότητα ασθενών ηλεκτρολυτών μεταβάλλεται. Συγκεκριμένα, για δραστικές ουσίες που είναι ασθενείς βάσεις παρατηρείται συνήθως μεγαλύτερη διαλυτότητα στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και τάση να καθιζάνουν καθώς διέρχονται κατά μήκος του γαστρεντερικού αυλού. Κατά την μεταφορά τους από τον στόμαχο στο δωδεκαδάκτυλο, πιθανόν να εμφανιστεί και υπερκορεσμός, ο οποίος όμως, λόγω θερμοδυναμικής αστάθειας, είναι πιθανό να οδηγήσει σε καθίζηση.

Το λεπτό έντερο αποτελεί την κύρια περιοχή απορρόφησης των δραστικών ουσιών. Η επίτευξη και διατήρηση υψηλών συγκεντρώσεων στην περιοχή αυτή, αποτελεί σημαντικό παράγοντα αύξησης της απορρόφησης και κατ' επέκταση βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας των δραστικών ουσιών. Με τις τεχνικές

δημιουργίας και διατήρησης υπέρκορης κατάστασης (spring and parachute effect), υψηλότερη ποσότητα ουσίας βρίσκεται εν διαλύσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα, περισσότερη ουσία να είναι διαθέσιμη προς απορρόφηση (Augustijns & Brewster, 2012; Bevernage et al., 2013). Κοινές μέθοδοι δημιουργίας υπέρκορης κατάστασης αποτελούν οι στερεές διασπορές, τα λιπιδικά προϊόντα και οι ενώσεις εγκλεισμού (σύμπλοκα) σε κυκλοδεξτρίνες (Kawakami, 2012; Kalepu & Nekkanti, 2015). Παρά το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα προϊόντα αυτά, δυστυχώς δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητές οι διεργασίες δημιουργίας και διατήρησης υπέρκορης κατάστασης ενδοαυλικά (Gao & Shi, 2012).

A.1 Στερεές διασπορές

Οι στερεές διασπορές, αποτελούν διασπορές ενός ή περισσότερων δραστικών συστατικών σε έναν υδρόφιλο φορέα σε στερεή κατάσταση (Li & Zhao, 2007). Αποτελούν μία από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους αύξησης διαλυτότητας δυσδιάλυτων λιπόφιλων δραστικών μορίων, καθώς, σε σύγκριση με τις μεθόδους διαλυτοποίησης (κυκλοδεξτρίνες, επιφανειοδραστικές ουσίες, συνδιαλύτες) αυξάνουν την διαλυτότητα χωρίς να επηρεάζουν την διαπερατότητά τους (Dahan et al., 2016). Οι πρώτες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς ήταν υδρόφιλες κρυσταλλικές (ουρία, οργανικά οξέα, σάκχαρα) και ημικρυσταλλικές (πολυμερή όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη και τα παράγωγά της). Αργότερα, χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς άμορφα πολυμερή, τόσο παράγωγα φυσικών προϊόντων (κυτταρίνης και αμύλου) όσο και πλήρως συνθετικά πολυμερή (παράγωγα πολυβινυλοπυρρολιδόνης) (Vasconcelos et al., 2007).

Οι άμορφες στερεές διασπορές αποτελούν συστήματα υψηλής ενέργειας που, όταν έρχονται σε επαφή με το μέσο διάλυσης, αποδεσμεύουν τη δραστική ουσία δημιουργώντας υπέρκορο διάλυμα (Guzmán et al., 2007; Brouwers et al., 2009). Επειδή η υπέρκορη κατάσταση είναι θερμοδυναμικά ασταθής, η δραστική ουσία μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα θα καθιζήσει και η συγκέντρωση σε κλειστό σύστημα θα προσεγγίσει τη διαλυτότητα κορεσμού. Έτσι, είναι πολύ σημαντική η ύπαρξη ενός παράγοντα που να διατηρεί τον υπερκορεσμό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται η προσθήκη κάποιου επιπλέον εκδόχου για τη διατήρηση της υπέρκορης κατάστασης για μεγαλύτερο χρονικό

διάστημα, πολλά από τα ήδη χρησιμοποιούμενα στις στερεές διασπορές πολυμερή εμφανίζουν και αυτή τη δράση. Παραδείγματα τέτοιων υδρόφιλων πολυμερών αποτελούν η πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) (Lindfors et al., 2008), η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) (Janssens et al., 2008), η υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC) (Raghavan et al., 2003) και η HPMC-AS (Ghosh et al., 2011; Sun & Lee, 2013). Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα πολυμερή παρατείνουν την διάρκεια της υπέρκορης κατάστασης δεν έχουν ακόμα πλήρως κατανοηθεί. Μερικοί από αυτούς τους τρόπους πιστεύεται ότι είναι η αύξηση ιξώδους του διαλύματος (Miller et al., 2008), η καταστολή της διαδικασίας πυρήνωσης (Raghavan et al., 2001), και η προσρόφηση στην επιφάνεια των σχηματιζόμενων πυρήνων κρυστάλλωσης εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξή τους (Simonelli et al., 1970; Plevbare et al., 2012).

Ένα σημαντικό πρόβλημα των στερεών διασπορών, αποτελεί η κρυσταλλοποίηση των άμορφων δραστικών συστατικών κατά την αποθήκευση. Η υγρασία μπορεί να οδηγήσει σε κρυσταλλοποίηση λόγω αυξημένης κινητικότητας των μορίων του φαρμάκου (Vasanthavada et al., 2004). Επίσης, η υγροσκοπικότητα ορισμένων πολυμερών μπορεί να οδηγήσει σε διαχωρισμό φάσεων, ανάπτυξη κρυστάλλων ή μετατροπή μίας μετασταθούς σε πιο σταθερή κρυσταλλική μορφή (Wang et al., 2005). Για την αποφυγή των καταστάσεων αυτών, είναι πολύ σημαντική η επιλογή κατάλληλου πολυμερούς, βέλτιστης ποσότητας δραστικής ουσίας και η σωστή συσκευασία και αποθήκευση του σκευάσματος. Η σταθεροποίηση των άμορφων στερεών διασπορών μπορεί να επιτευχθεί είτε με κινητική, είτε με θερμοδυναμική σταθεροποίηση ή με συνδυασμό και των δύο μεθόδων (Qian et al., 2010). Για κινητική σταθεροποίηση, θα πρέπει η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T_g της σύνθεσης να είναι τουλάχιστον 50 °C μεγαλύτερη από την μέγιστη θερμοκρασία αποθήκευσης του σκευάσματος (Hancock et al., 1995). Η θερμοδυναμική σταθεροποίηση είναι ανεξάρτητη της T_g , και οφείλεται στους διαμοριακούς δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ δραστικής ουσίας – πολυμερούς φορέα (πχ δεσμοί υδρογόνου, Van der Waals) (Chokshi et al., 2008; Huang et al., 2008).

Οι μέθοδοι παρασκευής άμορφων στερεών διασπορών, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: με χρήση οργανικών διαλυτών (εξάτμιση διαλύτη, συνκαθίζηση με προσθήκη αντιδιαλύτη, υπερκρίσιμα ρευστά)

(Meng et al., 2015) και με σύντηξη δραστικής ουσίας και φορέα (τεχνική εξώθησης-HME, τεχνική διασποράς KinetiSol-KSD κ.α) (Crowley et al., 2007; Miller et al., 2012). Γενικά οι μέθοδοι με χρήση οργανικού διαλύτη πραγματοποιούνται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες απ' ό τι οι μέθοδοι σύντηξης, οπότε μπορούν να εφαρμοστούν και σε θερμοευαίσθητες ουσίες. Όμως, καθώς οι περισσότεροι φορείς είναι υδρόφιλοι, η εύρεση κατάλληλου οργανικού διαλύτη στον οποίο να διαλύεται ο φορέας αποτελεί συχνά περιοριστικό παράγοντα.

Εκτός από νέες χαμηλής διαλυτότητας δραστικές ουσίες που εξ' αρχής μορφοποιούνται σε άμορφες στερεές διασπορές, αρκετά είναι και τα παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων φαρμάκων που μετατράπηκαν σε στερεές διασπορές για βελτίωση της αποτελεσματικότητάς τους.

Το αντιρετροϊκό σκεύασμα Kaletra[®] (λοπιναβίρη/ριτοναβίρη) αρχικά κυκλοφορούσε ως σκεύασμα μαλακού καψακίου ζελατίνης το οποίο, όμως, παρουσίαζε αρκετά προβλήματα (Klein et al., 2007). Η μεταφορά και συντήρησή του ήταν απαραίτητο να γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, οδηγώντας σε δυσκολία χρήσης του. Επίσης, σημαντικό πρόβλημα αποτελούσε και η αρκετά υψηλή συνιστώμενη ημερήσια δόση (έξι καψάκια με την λήψη τροφής). Το 2007 εγκρίθηκε από τον FDA η κυκλοφορία δισκίων Kaletra[®] ως άμορφη στερεή διασπορά παρασκευασμένη με την τεχνική εξώθησης τηγμένου υλικού (HME). Τα προβλήματα συντήρησης και δοσολογίας του φαρμάκου καθώς και οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις στα επίπεδα φαρμάκου στο αίμα λόγω λήψης τροφής αντιμετωπίστηκαν με την νέα αυτή μορφή.

Άλλο ένα φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αντιρετροϊκών, αποτελεί η ριτοναβίρη (Norvir[®]). Το σκεύασμα αρχικά κυκλοφορούσε σε καψάκια μαλακής ζελατίνης, όμως με την διαπίστωση της μετατροπής της κρυσταλλικής δομής I στην κρυσταλλική δομή II και μείωση της βιοδιαθεσιμότητάς του, κυκλοφόρησαν το 2010 δισκία ριτοναβίρης σε άμορφη στερεή διασπορά με φορέα το πολυμερές PVP. Το καινούριο προϊόν εμφάνιζε, παράλληλα με την αύξηση βιοδιαθεσιμότητας, και μικρότερη επίδραση τροφής στη δράση του (Chemburkar et al., 2000; Bauer et al., 2001).

Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η ποσακοναζόλη, ένα αντιμυκητιασικό φάρμακο της κατηγορίας των τριαζολών. Πριν το 2013, κυκλοφορούσε ως εναιώρημα

με την εμπορική ονομασία Noxafil[®]. Το προϊόν όμως, εμφάνιζε μεγάλη διακύμανση στην βιοδιαθεσιμότητα και αποτελεσματικότητά του (Wiederhold, 2016). Παράγοντες που είχαν αρνητική επίδραση στη δράση του αποτελούσαν το αυξημένο γαστρικό pH, η ναυτία και ο εμετός, καθώς και η αυξημένη γαστρεντερική κινητικότητα (Walsh et al., 2007; Krishna et al., 2009). Η λήψη τροφής εμφάνιζε επίσης σημαντική επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητά του, καθώς αύξανε τη διάλυση και απορρόφηση της λιπόφιλης δραστικής ουσίας (Courtney et al., 2004). Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, αναπτύχθηκε προϊόν άμορφης στερεής διασποράς ποσακοναζόλης σε pH-ευαίσθητο πολυμερή φορέα HPMC-AS με τη τεχνική εξώθησης τηγμένου υλικού (Kraft et al., 2014; Duarte et al., 2014; Cornely et al., 2016).

Παραδείγματα, φαρμακευτικών προϊόντων της μορφής των στερεών διασπορών, εγκεκριμένων από τον Αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA-Food and Drugs Association), παρουσιάζονται στον Πίνακα Α.1.

Πίνακας Α.1: Παραδείγματα προϊόντων άμορφων στερεών διασπορών εγκεκριμένων από τον Αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA) (Jermain et al., 2018).

Εμπορική ονομασία	Δραστική ουσία	Φαρμακευτική Εταιρεία	Έτος έγκρισης κυκλοφορίας
Cesamet [®]	Ναβιλόνη	Meda Pharmaceuticals	1985
Isoptin [®] SR	Βεραπαμίλη	Ranbaxy Laboratories	1987
Sporanox [®]	Ιτρακοναζόλη	Janssen	1992
Prograf [®]	Τακρόλιμους	Astellas Pharma	1994
NuvaRing [®]	Ετενογεστρέλη/ Αιθινυλοιστραδιόλη	Merck	2001
Kaletra [®]	Λοπιναβίρη/ ΡΙτοναβίρη	AbbVie	2007
Intelence [®]	Ετραβιρίνη	Janssen	2008
Modigraf [®]	Τακρόλιμους	Astellas Pharma	2009
Zortress [®]	Εβερόλιμους	Novartis	2010
Norvir [®] Tablet	ΡΙτοναβίρη	AbbVie	2010
Onmel [®]	Ιτρακοναζόλη	Merz Pharma	2010
INCIVEK [™]	Τελαπρεβίρη	Vertex	2011
Zelboraf [®]	Βεμουραφινίμπη	Roche	2011
Kalydeco [®]	Ιβακαφτόρη	Vertex	2012
Noxafil [®] Delayed-Release Tablet	Ποσακοναζόλη	Merck	2013
Astagraf XL [®]	Τακρόλιμους	Astellas Pharma	2013
Belsomra [®]	Σουβορεξάντη	Merck	2014
Harvoni [®]	Λεντιπασβίρη/ Σοφосπουβίρη	Gilead Sciences	2014
Viekira XR [™]	Δασαμπουβίρη/Ομπιτασβίρη/ Παριταπρεβίρη/ Ριτοναβίρη	AbbVie	2014
Epclusa [®]	Σοφосспουβίρη/ Βελπατασβίρη	Gilead Sciences	2016
Orkambi [®]	Λουμακαφτόρη/Ιβακαφτόρη	Vertex	2016
Venclexta [™]	Βενετοκλάξη	AbbVie	2016
Zepatier [®]	Ελμπασβίρη/Γραζοπρεβίρη	Merck	2016
Mavyret [™]	Γλεκαπεβίρη/Πιμπρεντασβίρη	AbbVie	2017

A.2 *In vitro* διατάξεις εκτίμησης ενδοαυλικής συμπεριφοράς

Η καθίζηση των δραστικών φαρμακευτικών μορίων στο γαστρεντερικό αυλό, μπορεί να επηρεάσει την απορρόφησή τους, ελαττώνοντας την βιοδιαθεσιμότητα και την θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα. Επίσης, η καθίζηση μπορεί να αυξήσει την ενδο- και διατομική μεταβλητότητα κατά την φάση κλινικών μελετών στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων, δυσκολεύοντας έτσι την απόδειξη της αποτελεσματικότητάς τους (Jakubiak et al., 2016).

Για την εκτίμηση του ενδοαυλικού υπερκορεσμού ή/και καθίζησης δραστικών φαρμακευτικών μορίων, χρησιμοποιούνται τόσο άμεσες όσο και έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού. Η απ' ευθείας μέτρηση ενδοαυλικών συγκεντρώσεων σε ανθρώπους, αποτελεί τον πιο αξιόπιστο τρόπο εκτίμησης του παρατηρούμενου υπερκορεσμού/ καθίζησης νέων φαρμακευτικών μορίων (Psachoulas et al., 2011; Rubbens et al., 2016; Hens et al., 2016a; Hens et al., 2016b; Kourentas et al., 2016b). Οι έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού μέσω *in vivo* (σε ανθρώπους ή ζώα) και *ex vivo* τεχνικών, αποτελούν επίσης χρήσιμους τρόπους πρόβλεψης της ενδοαυλικής συμπεριφοράς (Bevernaghe et al., 2012). Όμως, όλες αυτές οι τεχνικές είναι αρκετά χρονοβόρες, δαπανηρές και εγείρουν πολλά ηθικά ζητήματα. Επίσης, κατά τη χρήση πειραματοζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν οι υπάρχουσες διαφορές του γαστρεντερικού συστήματος μεταξύ των χρησιμοποιούμενων ζώων και των ανθρώπων (Griffin et al., 2014). Συνεπώς, η ανάπτυξη αξιόπιστων *in vitro* τεχνικών και διατάξεων εκτίμησης της ενδοαυλικής συμπεριφοράς φαρμακευτικών ουσιών, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την πρόβλεψη του ενδοαυλικού υπερκορεσμού ή/και της καθίζησης.

Οι διατάξεις καλαθίσκου και περιστρεφόμενου πτερυγίου (USP I και USP II apparatus), ήταν οι πρώτες που προτάθηκαν από την Αμερικάνικη Φαρμακοποιεία για εκτίμηση χαρακτηριστικών διαλυτότητας χορηγούμενων *per os* φαρμακομορφών (Dokoumetzidis & Macheras, 2006). Η αρχική χρήση τους, ήταν κυρίως για έλεγχο ποιότητας προϊόντων (Kostewicz et al., 2014) με τους χρησιμοποιούμενους όγκους να ξεπερνούσαν κατά πολύ τους φυσιολογικά παρατηρούμενους κατά την διαπεπτική περίοδο (500-1000 ml, αντί $\approx$ 250 ml στο στομάχι και $\approx$ 30-100 ml στο άνω τμήμα λεπτού εντέρου) (Schiller et al., 2005; Mudie et al., 2014; Kourentas et al., 2016a). Επίσης, τα απλά υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως

μέσα διάλυσης αποδείχθηκε ότι ήταν ανεπαρκή για την εκτίμηση της *in vivo* διαλυτότητας φαρμακευτικών ουσιών, και έτσι, αντικαταστάθηκαν με νέα υγρά μέσα προσομοίωσης (Wagner et al., 2012; Markopoulos et al., 2015). Ένα επιπλέον μειονέκτημα των διατάξεων USP I και USP II ήταν η αδυναμία προσομοίωσης της μεταφοράς του εξεταζόμενου φαρμακευτικού προϊόντος από το στόμαχο στα διάφορα τμήματα του λεπτού εντέρου.

Οι διατάξεις USP III (reciprocating cylinder, “Bio-Diss”) και USP IV (flow through cells), αν και επιτρέπουν την αλλαγή των μέσων προσομοίωσης κατά την διάρκεια του πειράματος, ωστόσο, δεν είναι κατάλληλες για μελέτη καθίζησης, καθώς το διαλυμένο φάρμακο είτε δεν μεταφέρεται κατά μήκος της σειράς των κυλίνδρων (USP III), είτε δεν παραμένει στο ποτήρι διάλυσης (USP IV).

Έτσι, η ανάπτυξη *in vitro* διατάξεων προσομοίωσης της γαστρεντερικής διάβασης, μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη για την μελέτη διάλυσης ή/και καθίζησης φαρμακευτικών ουσιών κατά μήκος του γαστρεντερικού αυλού. Η χρησιμότητά τους αφορά τόσο τα αρχικά στάδια ανάπτυξης μίας φαρμακευτικής ουσίας όταν η διαθέσιμη ποσότητά της είναι περιορισμένη (διατάξεις μικρής κλίμακας), όσο και τα μετέπειτα στάδια μορφοποίησης (διατάξεις μεγάλης κλίμακας).

Στη συνέχεια του κειμένου αναφέρονται *in vitro* διατάξεις που αναπτύχθηκαν για την μελέτη της διάλυσης και της καθίζησης φαρμακευτικών ουσιών. Η παρουσίαση βασίστηκε σε μεγάλο βαθμό σε πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης (O'Dwyer et al., 2018).

A.2.1 Διατάξεις μικρής κλίμακας

Όλο και περισσότερο έντονη γίνεται η ανάγκη για ανάπτυξη μικρής κλίμακας πειραματικών διατάξεων για εκτίμηση της διάλυσης, της καθίζησης και του υπερκορεσμού στη φαρμακευτική βιομηχανία. Ειδικά στα πρώτα στάδια ανάπτυξης, όταν η ποσότητα της δραστικής ουσίας είναι περιορισμένη, καθώς και στην αξιολόγηση καινούριων φαρμακομορφών οι διατάξεις αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες (Kuentz, 2015). Επίσης, σημαντική είναι η συμβολή τους και στη μείωση των απαιτούμενων κεφαλαίων, καθώς ελαττώνονται οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι μέσων προσομοίωσης. Μία πρώτη προσπάθεια, έγινε με την ανάπτυξη μικρότερου όγκου

διατάξεων διάλυσης τύπου USP II. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο μισός όγκος μέσου διάλυσης συγκριτικά με τον αρχικό (250 ml αντί για 500 ml), δίνοντας σε αρκετές περιπτώσεις παρόμοια αποτελέσματα (Klein, 2006; Klein & Shah, 2008). Όμως, ακόμα μικρότερης κλίμακας συσκευές είναι επιθυμητές.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά οι χρησιμοποιούμενες μικρής κλίμακας διατάξεις για μελέτη διάλυσης φαρμακευτικών ουσιών.

1. Μέθοδοι μικροπλακών 96-φρεατίων

1.1 Σταθερή τιμή pH

Οι Alsenz et. al, ανέπτυξαν το 2007 μία μερικώς αυτοματοποιημένη μέθοδο προσδιορισμού διαλυτότητας (Partially Automated Solubility Screening-PASS) (Alsenz et al., 2007; Alsenz & Kansy, 2007). Η δραστική ουσία αρχικά διαλύεται ή διασπείρεται σε επτάνιο, πριν τον διαμοιρασμό της σε μικροπλάκα 96-φρεατίων. Στη συνέχεια, αφού το επτάνιο απομακρυνθεί με φυγοκέντρωση υπό κενό, προστίθεται σε κάθε φρεάτιο κατάλληλη ποσότητα μέσου διάλυσης και μαγνητικός αναδευτήρας. Τα δείγματα αφήνονται 24 ώρες για επώαση. Με τη πάροδο του διαστήματος αυτού, τα δείγματα διέρχονται από ηθμούς και μετράται η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο διήθημα με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography – UPLC). Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της διαλυτότητας 42 φαρμακευτικών ουσιών σε 18 διαφορετικούς φορείς. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ικανοποιητικά, καθώς βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση με τιμές από προηγούμενες μελέτες διαλυτότητας ($R^2=0,882$). Επίσης, ο προσδιορισμός της διαλυτότητας βοηθά σε μία πρώτη έμμεση εκτίμηση πιθανής καθίζησης του φαρμάκου κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξής του. Για παράδειγμα, η παρατηρούμενη μείωση της διαλυτότητας της κετοκοναζόλης σε υγρό μέσο προσομοίωσης εντέρου (FaSSIF) (0,017 mg/ml) σε σχέση με τη διαλυτότητά της σε μέσα προσομοίωσης στομάχου (SGF) (418,13 mg/ml) με την μέθοδο PASS, δείχνει να είναι πιθανή η καθίζησή της κατά την μεταφορά από το γαστρικό στο εντερικό περιβάλλον. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η αδυναμία εφαρμογής της για μέτρηση διαλυτότητας σε φορείς υψηλού ιξώδους, εξαιτίας του χρησιμοποιούμενου αυτοματοποιημένου συστήματος διαμοιρασμού.

Οι Dai et al. ανέπτυξαν ένα παρόμοιο σύστημα γρήγορου προσδιορισμού διαλυτότητας και καθίζησης φαρμακευτικών ουσιών, χρησιμοποιώντας μία μικροπλάκα 96-φρεατίων (Dai et al., 2007a; Dai et al., 2007b; Dai et al., 2008a; Dai et al., 2008b). Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, η ουσία αρχικά διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη (n-προπανόλη) και διαμοιράζεται αυτόματα στα φρεάτια της μικροπλάκας. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη με φυγοκέντρωση υπό κενό, σε κάθε φρεάτιο παραμένουν περίπου 10 - 40 µg δραστικής ουσίας και 0,4 mg εκδόχων. Στη συνέχεια, προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα μέσων προσομοίωσης (επιπέδου I ή II) (Markopoulos et al., 2015) και ακολουθεί επώαση σε σταθερή θερμοκρασία. Σε συγκεκριμένους χρόνους, τα δείγματα διηθούνται υπό κενό και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας.

Οι προαναφερθείσες μέθοδοι προσδιορισμού διαλυτότητας/καθίζησης, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για διάφορους τύπους φαρμακευτικών μορφών, όπως αυτογαλακτωματοποιούμενα συστήματα μεταφοράς (Mansky et al., 2007), λιπιδικές μορφές (Dai et al., 2006) και στερεές διασπορές. Τα αποτελέσματα αυτά, εμφάνισαν πολύ καλή συσχέτιση με τα αντίστοιχα που ελήφθησαν με χρήση της κλασικής συσκευής διάλυσης USP II και από μελέτες σε ποντίκια (Dai et al., 2006) και σκυλιά (Dai et al., 2007b). Οι Dai et al. (2007b), χρησιμοποίησαν τη συγκεκριμένη μέθοδο για την εκτίμηση της καθίζησης διαφόρων μορφών μίας ελάχιστα υδατοδιαλυτής ουσίας (JNJ-25894934). Ανάλογα με τον παρατηρούμενο βαθμό καθίζησης, οι μορφές κατατάχθηκαν σε τρεις κατηγορίες: γρήγορης, αργής και μηδαμινής καθίζησης. Με μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των μορφών αυτών μετά από χορήγηση σε σκυλιά, παρατηρήθηκε ότι οι μορφές γρήγορης καθίζησης εμφάνιζαν την χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα στα σκυλιά, ενώ οι μορφές αργής και μηδαμινής καθίζησης εμφάνιζαν παρόμοια βιοδιαθεσιμότητα. Αυτό αποδόθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση χολικών αλάτων και λεκιθίνης που υπάρχει φυσιολογικά στο εντερικό περιβάλλον των σκύλων σε σύγκριση με τα υγρά μέσα προσομοίωσης (FaSSIF Level I ή II) που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες.

Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται στις συγκεκριμένες τεχνικές προσδιορισμού είναι της τάξης των μικρογραμμαρίων και καθώς χρησιμοποιείται υγρό μέσο για την αρχική διάλυση της ουσίας, παρακάμπτεται η χρήση ακριβού διανομέα κόνεων καθώς και οι δυσκολίες χειρισμού στερεών, ημιστερεών και υψηλού ιξώδους εκδόχων. Όμως, η χρήση του υγρού μέσου διάλυσης εγείρει

προβληματισμούς σχετικά με πιθανή αλλαγή της κρυσταλλικής μορφής της δραστικής ουσίας κατά το στάδιο της απομάκρυνσής του (Dai, 2010). Ένα επιπλέον πρόβλημα, αποτελεί και η πιθανότητα μη αποτελεσματικής απομάκρυνσης της ολικής ποσότητας του διαλύτη κατά το στάδιο της υπό κενό φυγοκέντρωσης, με αποτέλεσμα υπερεκτίμηση της διαλυτότητας του φαρμάκου μετά την προσθήκη του υγρού μέσου διάλυσης. Τέλος, η μέθοδος αυτή εξετάζει την καθίζηση της εξεταζόμενης ουσίας μόνο βάσει της διαλυτότητάς της στο μέσο προσομοίωσης αγνοώντας την επίδραση της απορρόφησής της ενδοαυτικά. Έτσι, αυξάνεται ο κίνδυνος υπερεκτίμησης της καθίζησης ουσιών υψηλής διαπερατότητας.

Οι Chandran et al. (2011), πρότειναν μία παρόμοια διάταξη μικρής κλίμακας για την εκτίμηση της καθίζησης φαρμάκων. Αρχικά, παρασκευάζεται ένα διάλυμα παρακαταθήκης της δραστικής ουσίας χρησιμοποιώντας ως φορέα πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) 400 και διαφορετικούς αναστολείς καθίζησης. Σε μία μικροπλάκα 96-φρεατίων μεταφέρονται από 100 μl διαλύματος παρακαταθήκης και 100 μl απιονισμένου νερού σε κάθε φρεάτιο. Μετράται η απορρόφηση στα 500 nm, δηλαδή σε μήκος κύματος αρκετά μεγαλύτερο από την περιοχή απορρόφησης οποιασδήποτε εξεταζόμενης ουσίας. Η αρχικά υψηλή απορρόφηση, αποδόθηκε στα μικρά αιωρούμενα σωματίδια του διαλύματος που προκαλούν σκέδαση του φωτός, ενώ καθώς τα σωματίδια αυτά συσσωματώνονται και καθιζάνουν, αυξάνεται η διαπερατότητα του μέσου, με αποτέλεσμα, ελάττωση της απορρόφησης. Τα αποτελέσματα με την συγκεκριμένη μέθοδο, εμφάνισαν αρκετά καλή συσχέτιση με αντίστοιχα που ελήφθησαν με παραδοσιακές μεθόδους προσδιορισμού με υπερυψηλής απόδοσης υγρή φασματοφωτομετρία. Συγκεκριμένα, και οι δύο μέθοδοι έδειξαν ότι η αποτελεσματικότερη ποσότητα αναστολέα καθίζησης TPGS (d- α -tocopheryl-polyethylene-glycol 1000 succinate) για την καμφορά σε PEG 400 είναι 5% w/w. Σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης του φάσματος φωτομέτρου, αποτελεί η γρήγορη και απλή εκτίμηση της καθίζησης του φαρμάκου με την παρουσία διαφορετικών εκδόχων σε διάφορα χρονικά σημεία, χωρίς επιπλέον επεξεργασία του δείγματος ή άσκοπες απώλειές του.

1.2 Ενσωμάτωση αλλαγής τιμής pH

Οι Klein et al. (2012), προσπάθησαν να αναπτύξουν ένα μικρής κλίμακας σύστημα προσομοίωσης της μεταφοράς από το γαστρικό στο δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον. Εξετάστηκαν δύο διαφορετικές πειραματικές διατάξεις: μία με χρήση μικροπλάκας 96-φρεατίων και μία συσκευή με ανάδευση με πτερύγιο (μικρής κλίμακας). Στη πρώτη περίπτωση, το φάρμακο διαλύεται αρχικά σε SGF από το οποίο λαμβάνονται στη συνέχεια 30 μ l και μεταφέρονται σε 170 μ l FaSSIF ή FeSSIF και ανά δύο λεπτά μετράται η συγκέντρωση με απορρόφηση στο υπεριώδες. Στη διάταξη μικρού περιστρεφόμενου πτερυγίου, το φάρμακο διαλύεται αρχικά σε 10 ml SGF που στη συνέχεια μεταφέρονται σε 40 ml FaSSIF ή FeSSIF και προσδιορίζεται η συγκέντρωση με HPLC. Και οι δύο διατάξεις έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα κατά την μελέτη συμπλόκων ταμοξιφαίνης και ιτρακοναζόλης με υδροξυβουτυλο- β -κυκλοδεξτρίνη. Συγκεκριμένα, η ταμοξιφαίνη δεν εμφάνιζε σημαντική καθίζηση ενώ η ιτρακοναζόλη παρουσίαζε καθίζηση της τάξης του 90 % και στις δύο διατάξεις.

Οι Alsenz et al. (2016), ανέπτυξαν το MINDISS (Miniaturised Intrinsic Dissolution Screening), μία τεχνική για την μελέτη του ενδογενούς ρυθμού διάλυσης δισκίων φαρμακευτικών ουσιών. Μικρά δισκία συμπιεσμένης δραστικής ουσίας βάρους 2-5 mg, παρασκευάζονται σε ειδικά σχεδιασμένη θήκη, ώστε η τελική τους επιφάνεια να είναι 3 mm², και μεταφέρονται στις κοιλότητες μίας μικροπλάκας 96-φρεατίων. Μέσο διάλυσης (0,35 ml) προστίθεται σε κάθε φρεάτιο, καλύπτοντας πλήρως το δισκίο, και ακολουθεί ανάδευση. Μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, τα δισκία μεταφέρονται σε καινούρια κυψελίδα με νέο μέσο διάλυσης με τιμή pH που προσομοιώνει το περιβάλλον στα χαμηλότερα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα. Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και φασματοσκοπία Raman για την ανάλυση των χαρακτηριστικών της στερεής φάσης του δισκίου. Η μέθοδος παρουσίασε καλή συσχέτιση με μεγαλύτερης κλίμακας διατάξεις μέτρησης διαλυτότητας δισκίων ($R^2 = 0,9292$). Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο MINDISS βρέθηκε ότι ο ενδογενής ρυθμός διάλυσης δισκίων δύο αλάτων της δικλοφαινικής (νατριούχου και καλιούχου) σε SGF (pH=1,2) είναι ίδιος με αυτόν του ελεύθερου οξέος. Αυτό οφείλεται σε σχηματισμό μίας στοιβάδας ελεύθερου οξέος στην επιφάνεια του δισκίου που ελέγχει τον ρυθμό διάλυσής του και αυξάνει την καθίζησή του στο γαστρικό περιβάλλον. Η ελεύθερη βάση αναμένεται να παρουσιάζει την

ακριβώς αντίθετη συμπεριφορά, παραμένοντας διαλυμένη στο όξινο γαστρικό περιβάλλον και καθιζάνοντας στο πιο αλκαλικό περιβάλλον του εντέρου.

1.3 Ενσωμάτωση αλλαγής διαλύτη

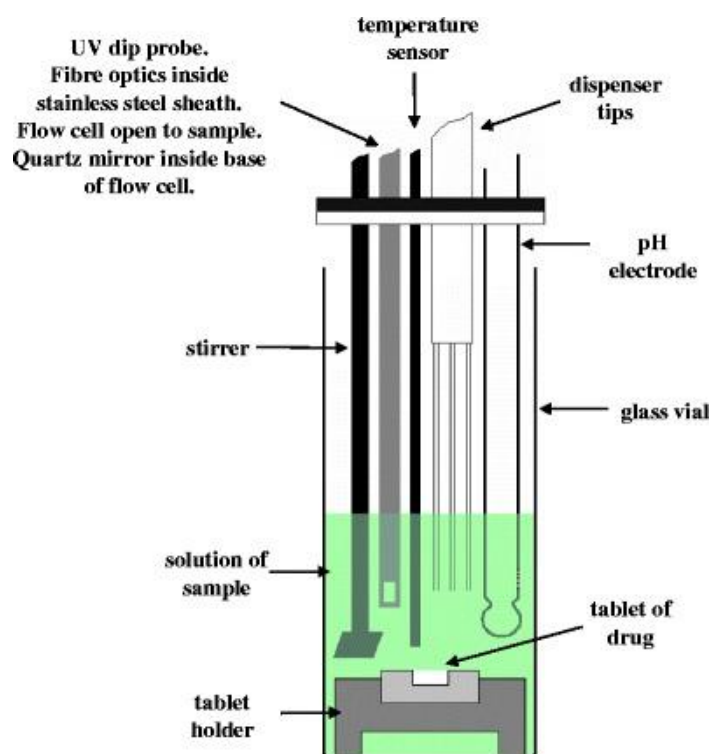
Οι Yamashita et al. το 2011, προσπάθησαν να εκτιμήσουν την καθίζηση με μία μέθοδο που περιελάμβανε και αλλαγή διαλύτη. Αρχικά, παρασκευάζεται ένα διάλυμα παρακαταθήκης υψηλής συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας σε DMSO που στη συνέχεια αραιώνεται με FaSSIF σε μία μικροπλάκα 96-φρεατίων. Η καθίζηση ελέγχεται με HPLC/UV ανάλυση. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας διαφόρων εκδόχων στην παρεμπόδιση καθίζησης της ιπρακοναζόλης στο FaSSIF. Τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με τα αντίστοιχα που ελήφθησαν από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με μεγαλύτερες διατάξεις περιστρεφόμενου πτερυγίου. Και οι δύο διατάξεις έδιναν ως αποτελεσματικότερο αναστολέα καθίζησης το HPMC-AS (hydroxypropyl methylcellulose-acetate succinate).

Οι Petrusenka et al. (2013a), ανέπτυξαν ένα υψηλής απόδοσης σύστημα αξιολόγησης της επίδρασης διαφόρων αναστολέων καθίζησης στη καθίζηση χαμηλής διαλυτότητας δραστικών ουσιών. Αρχικά, παρασκεύασαν διάλυμα παρακαταθήκης της ουσίας σε DMSO, το οποίο στη συνέχεια μετέφεραν στα φρεάτια μίας μικροπλάκας 96-φρεατίων οι οποίες περιείχαν ήδη ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Macellvaine's (pH=6,8) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις εκδόχου (0,001%, 0,01% και 0,1% w/v). Ακολούθησε ανάδευση για 5 δευτερόλεπτα για επίτευξη επαρκούς ανάμιξης. Η πλάκα επώαστηκε σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και ακολούθως έγινε λήψη δειγμάτων σε καθορισμένους χρόνους, για διάστημα 360 λεπτών. Παράγοντες που μπορεί να επηρέαζαν το πείραμα είχαν ελεγχθεί και προσδιορίζεται προηγουμένως (συχνότητα ανάδευσης, θερμοκρασία επώασης, συγκέντρωση DMSO). Εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα 23 διαφορετικών αναστολέων καθίζησης για δύο χαμηλής διαλυτότητας φάρμακα, την καρβαμαζεπίνη και την φαινοφιβράτη. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για μία πρώτη εκτίμηση της αποτελεσματικότητας διαφορετικών αναστολέων καθίζησης.

Σε μία μετέπειτα μελέτη τους, οι Petrusenka et al. (2013b) προσπάθησαν να αξιολογήσουν την χρησιμότητα της σκέδασης και της θολερότητας του φωτός στον προσδιορισμό της καθίζησης δραστικών ουσιών και της αποτελεσματικότητας αναστολέων καθίζησης. Η σκέδαση του φωτός μετρήθηκε με νεφελόμετρο, ενώ για την θολερότητα χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία με μήκος κύματος 500 nm. Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία όπως και στην προηγούμενη μελέτη, για τις ουσίες διπυριδαμόλη και φαινοφιβράτη. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας κλασικές μεθόδους ανάλυσης, όπως UPLC. Οι συγγραφείς προτίμησαν την σκέδαση του φωτός έναντι της θολοσιμετρίας, καθώς έδινε λιγότερα ψευδώς θετικά (4 έναντι 5) και λιγότερα ψευδώς αρνητικά (0 έναντι 2) στην εκτίμηση αποτελεσματικότητας αναστολέων καθίζησης.

2. Λοιπές διατάξεις μικρής κλίμακας

Οι Gravestock et al. το 2011, χρησιμοποίησαν την συσκευή T₃ (Sirius Analytical Instruments) για να ελέγξουν την καθίζηση διαφόρων δραστικών ουσιών με βασικές, όξινες και ουδέτερες ιδιότητες. Η συσκευή T₃ είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα τιτλοδότησης που παρακολουθεί την συγκέντρωση της ουσίας σε πραγματικό χρόνο με οπτικές ίνες που συνδέονται με ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων υπεριώδους (Σχήμα A.1). Με αυτό τον τρόπο, αποφεύγονται τυχόν σφάλματα λόγω παραμονής του δείγματος πριν την ανάλυση. Μελετήθηκε η διάλυση και η καθίζηση φαρμάκων σε 15 ml διαλύματος KCl 0,15 M σε συγκεκριμένες τιμές pH (1,9, 3,8, 5,2 και 7,2). Το αρχικό pH ήταν 1,9 και ανά 30 λεπτά αυξανόταν. Κάθε ουσία ανάλογα με τις ιδιότητές της παρουσίαζε διαφορετική συμπεριφορά: οι όξινες ενώσεις εμφάνιζαν αυξημένο ρυθμό διάλυσης σε αλκαλικό περιβάλλον, οι ουδέτερες παρόμοιο και σε όξινο και σε αλκαλικό pH, ενώ από τις βασικές μερικές παρουσιάζουν καθίζηση με την αύξηση του pH ενώ άλλες όχι.



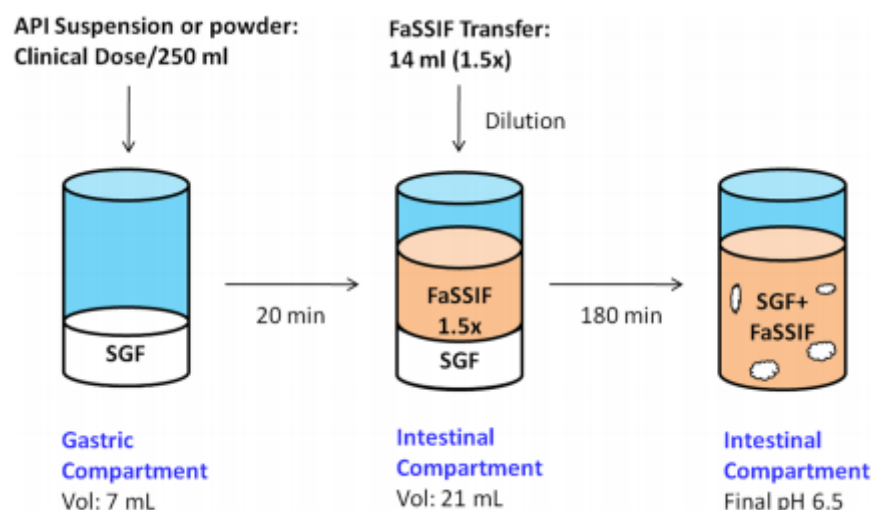
Σχήμα Α.1: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής μελέτης διάλυσης T₃ της Sirius Analytical Instruments (Box et al., 2016).

Το 2016 οι Jakubiak et al. χρησιμοποίησαν την συσκευή T₃ για να αναπτύξουν ένα μοντέλο μελέτης διάλυσης και καθίζησης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές τιμές pH (2 και 6,5) προσομοιώνοντας το γαστρικό και εντερικό περιβάλλον αντίστοιχα. Η ουσία παρέμενε για 10 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=2, και στη συνέχεια, προστίθετο συγκεκριμένη ποσότητα συμπυκνωμένου FaSSIF ώστε να προσομοιωθεί η μεταφορά από το γαστρικό στο εντερικό περιβάλλον. Τα προφίλ συγκέντρωσης στο πλάσμα δύο φαρμάκων (διπυριδαμόλη και ερλοτινίμη) που προβλέφθηκαν βάσει του μοντέλου αυτού, παρουσίασαν πολύ καλή συσχέτιση με in vivo δεδομένα συγκέντρωσης των φαρμάκων στο πλάσμα από προηγούμενες μελέτες.

Παρόμοια τεχνική ανάλυσης με οπτικές ίνες περιλαμβάνει και το σύστημα μDiss (Pion Inc.) που αναπτύχθηκε για μελέτη διαλυτότητας και ρυθμού διάλυσης σε πραγματικό χρόνο. Επίσης, δίνει την δυνατότητα λήψης πληροφοριών και για υπερκορεσμό ή καθίζηση φαρμάκων, καθώς και για τη διάλυση φαρμάκου από κόνις ή μικρά δισκία (Tsinman et al., 2009; Avdeef et al., 2009). Η μέθοδος μπορεί να

χρησιμοποιηθεί σε όγκους μέσων από 1-10 ml. Επίσης, δίνεται η δυνατότητα να πραγματοποιούνται παράλληλα μέχρι και οχτώ διαφορετικά πειράματα. Οι Palmelund et al. (2016) χρησιμοποίησαν το σύστημα μDiss για να αναπτύξουν μία *in vitro* τυποποιημένη μέθοδο προσδιορισμού υπερκορεσμού και καθίζησης (SSPM). Αρχικά, παρασκευαζόταν ένα υψηλής συγκέντρωσης διάλυμα παρακαταθήκης του φαρμάκου, από το οποίο 200 μl μεταφέρονταν σε 10 ml FaSSIF στους 37 °C. Η συγκέντρωση παρακολουθούνταν συνεχώς για τουλάχιστον 60 λεπτά. Η καθίζηση ανιχνευόταν με μείωση της συγκέντρωσης. Το 2017, οι Plum et al. εξέτασαν την διεργαστηριακή επαναληψιμότητα της μεθόδου συγκρίνοντας αποτελέσματα για τρία φάρμακα (απρεπιτάντη, φελοδιπίνη, φαινοφιβράτη) σε επτά διαφορετικά εργαστήρια. Συγκρίθηκαν ο φαινόμενος βαθμός υπερκορεσμού (aDS) και ο χρόνος επαγωγής καθίζησης (t_{ind}) για κάθε φάρμακο. Άμεση σύγκριση των τιμών αυτών για τα τρία φάρμακα δεν ήταν δυνατή, όμως παρατηρήθηκε ότι το 80% των εργαστηρίων έδιναν την ίδια κατάταξη φαρμάκων, όταν συγκρίθηκαν οι τιμές της κλίσης του διαγράμματος $\ln(t_{ind})$ προς $\ln(aDS)^{-2}$ για κάθε φάρμακο.

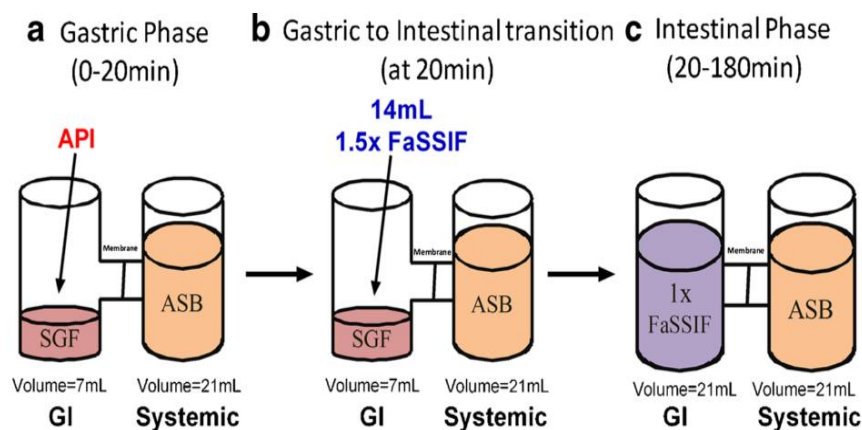
Οι Mathias et al. (2013) ανέπτυξαν μία άλλη διάταξη για μελέτη διάλυσης και καθίζησης φαρμάκων (Σχήμα A.2). Το φάρμακο (σκόνη ή εναιώρημα), αρχικά μεταφέρονταν σε 7 ml SGF. Μετά από 20 λεπτά, προστίθεντο 14 ml συμπυκνωμένου FaSSIF (x1,5) διαμορφώνοντας το τελικό pH σε 6,5 προσομοιώνοντας έτσι το περιβάλλον στο έντερο. Το διάλυμα επωάζονταν για άλλα 160 λεπτά. Δύο από τα φάρμακα που εξετάστηκαν αποτελούν η κετοκοναζόλη και η ερλοτινίμη. Η κετοκοναζόλη παρέμενε σε υπέρκορη κατάσταση για περίπου 55 λεπτά και στη συνέχεια καθίζανε αργά για τα υπόλοιπα 75 λεπτά. Η ερλοτινίμη καθίζανε γρήγορα με την προσθήκη του FaSSIF, φτάνοντας την διαλυτότητα κορεσμού της σταθερής κρυσταλλικής της μορφής.



Σχήμα Α.2: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας που ακολούθησαν για την μελέτη διαλυτότητας και καθίζησης δραστικών φαρμακευτικών ουσιών οι Mathias et al. (2013).

Ένα σύστημα δύο διαμερισμάτων, μFlux, αναπτύχθηκε από την Pion Inc για την μελέτη διάλυσης φαρμάκων (Tsinman et al, 2013). Τα δύο διαμερίσματα χωρίζονται από μία μεμβράνη (Caco-2, MDCK κύτταρα ή μεμβράνη PAMPA) και οι συγκεντρώσεις στα δύο διαμερίσματα μετρώνται συνεχώς με χρήση οπτικών ινών UV. Η διαπέραση του φαρμάκου μέσω της μεμβράνης στο διαμέρισμα-δέκτη, προσομοιώνει την διαδικασία απορρόφησης του φαρμάκου στο σώμα. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη καθίζησης φαρμάκων καθώς η απορρόφηση μπορεί να δημιουργήσει συνθήκες δεξαμενής στο διαμέρισμα-δότη. Οι Zu et al. (2016) χρησιμοποίησαν την συσκευή μFlux για να μελετήσουν την επίδραση του αυξημένου γαστρικού pH στη διάλυση διαφόρων φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων της κετοконаζόλης και της νιλοτινίμπης (Σχήμα Α.3). Ποσότητα 400 μl εναιωρήματος του φαρμάκου μεταφερόταν στο διαμέρισμα-δότη που περιελάμβανε 7 ml γαστρικού υγρού (με pH=2 για τις κανονικές συνθήκες ή pH=6 για τις αλκαλικές). Το διαμέρισμα-δέκτης περιελάμβανε 21 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά από 20 λεπτά, προστίθεντο 14 ml 1,5 φορές συμπυκνωμένου FaSSIF στο διαμέρισμα-δότη (οδηγώντας σε τελικό pH=6,5). Ακολουθούσε παρακολούθηση των συγκεντρώσεων και στα δύο διαμερίσματα για 160 λεπτά. Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν βιομιμική μεμβράνη καλυμμένη με λιπίδια. Η

κετοκοναζόλη, στην περίπτωση του κανονικού γαστρικού pH, παρέμενε σε υπέρκορη κατάσταση για τουλάχιστον 20 λεπτά μετά την προσθήκη του FaSSIF με αποτέλεσμα να κατανέμεται μεταξύ των δύο διαμερισμάτων, ενώ η νιλοτινίμη ήταν μόνο προσωρινά υπέρκορη με την προσθήκη του FaSSIF και καθίζανε ταχύτατα.



Σχήμα A.3: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης μελέτης διάλυσης-διαπερατότητας μ Flux που χρησιμοποιήθηκε από τους Zu et al., 2016.

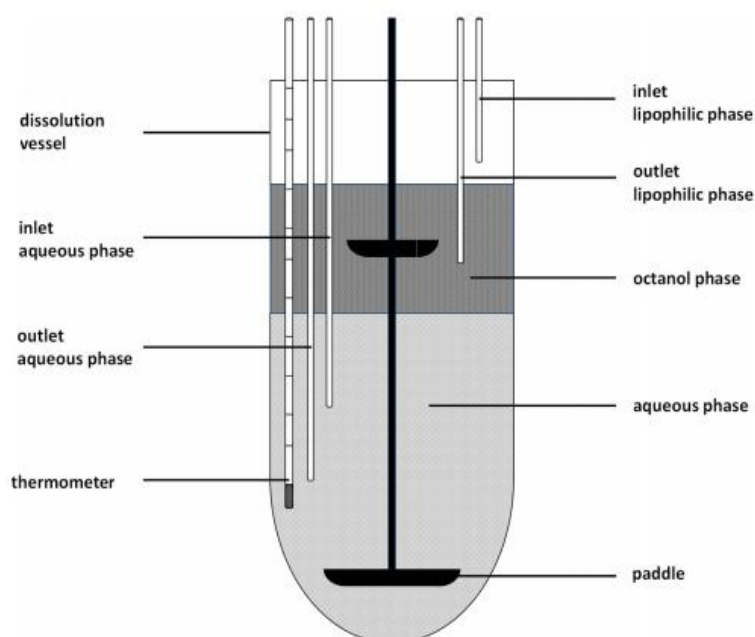
2.1 Μικρής κλίμακας διφασικές διατάξεις μελέτης διαδικασίας διάλυσης.

Για την προσομοίωση της διαδικασίας απορρόφησης κατά την διάρκεια μίας *in vitro* μελέτης διάλυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η παρουσία μίας στοιβάδας οργανικού διαλύτη. Η κατανομή του φαρμάκου μεταξύ των δύο στοιβάδων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε μελέτες καθίζησης, καθώς βοηθάει να δημιουργηθούν συνθήκες δεξαμενής στην υδατική φάση. Όμως, τα διφασικά πειράματα εμφανίζουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως είναι η άμεση επαφή της οργανικής με την υδατική στοιβάδα, το οποίο δεν συμβαίνει φυσιολογικά στο σώμα, με κίνδυνο μέρος της οργανικής στοιβάδας να διαλυματοποιηθεί στην υδατική σχηματίζοντας τελικά γαλάκτωμα. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που υπάρχουν επιφανειοδραστικές ουσίες στην υδατική φάση, όπως συμβαίνει σε σκευάσματα με αυξημένες δυνατότητες.

Η διάταξη inForm (Sirius Analytical) έχει χρησιμοποιηθεί και για πειράματα μίας φάσης και για διφασικά (Watson et al, 2016). Τόσο η συγκέντρωση όσο και το

pH ελέγχονται σε πραγματικό χρόνο με οπτικές ίνες UV και ηλεκτρόδιο μέτρησης pH στο μέσο. Τα φάρμακα αρχικά διαλύονται σε DMSO για παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης. Δείγματα μεταφέρονται αυτόματα με βελόνα στην υδατική φάση η οποία αποτελείται από 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικών-φωσφορικών με pH=6,5. Η οργανική στοιβάδα αποτελείται από 30 ml δεκανόλη και βρίσκεται πάνω από την υδατική. Όλες οι βασικές και ουδέτερες ενώσεις καθίζαναν όταν προστίθενται στην υδατική φάση σε δόση 10 mg. Η φαινοφιβράτη εξετάστηκε σε δύο δόσεις (5 και 10 mg). Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε καθίζηση του φαρμάκου και η ποσότητα που κατανέμετο στην οργανική στοιβάδα εντός μίας ώρας ήταν η ίδια. Η συμπεριφορά αυτή αποδόθηκε στην ταχύτατη κατακρήμνιση της φαινοφιβράτης και την επίτευξη διαλυτότητας κορεσμού στην υδατική φάση, επιτρέποντας έτσι μόνο στη διαλυμένη ποσότητα να κατανεμηθεί στην οργανική στοιβάδα. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν δημοσιευθεί πειράματα με αλλαγή pH στο σύστημα αυτό.

Διφασικό σύστημα με ενσωματωμένη αλλαγή τιμής pH διαλύματος αποτελεί το miBidi-pH (miniscale biphasic dissolution model with pH-shift) (Frank et al., 2014) (Σχήμα A.4). Το σύστημα αποτελείται από μία μικρής κλίμακας USP II διάταξη διάλυσης που περιέχει 50 ml υδατικής φάσης καλυμμένο με 15 ml οκτανόλης (οργανική στοιβάδα). Η συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχεται με φασματομετρία υπεριώδους. Οι Frank et al. (2014) χρησιμοποίησαν το σύστημα για να μελετήσουν την *in vivo* διαδικασία διάλυσης δύο ασθενώς βασικών ουσιών: της διπυριδαμόλης και του BIXX. Και για τα δύο φάρμακα παρατηρήθηκε καθίζηση στο πιο ουδέτερο pH του εντερικού περιβάλλοντος. Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων του διφασικού πειράματος με *in vivo* δεδομένα βελτιώθηκε και για τα δύο φάρμακα, σε σχέση με τις διατάξεις μίας μόνο φάσης. Για το BIXX κατέστη δυνατή και η ανάπτυξη συσχέτισης μεταξύ του κλάσματος φαρμάκου που απορροφάται *in vivo* και του κλάσματος που μεταφέρεται στην οργανική στοιβάδα *in vitro*.

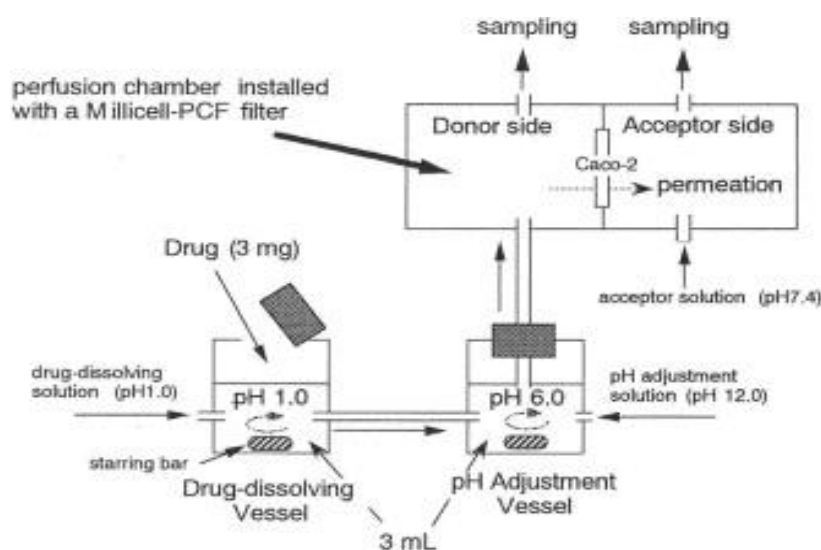


Σχήμα Α.4: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης miBldi-pH (Frank et al., 2014).

2.2 Μικρής κλίμακας διατάξεις σε συνδυασμό με σειρές κυττάρων Caco-2

Οι Kobayashi et al. (2001) πρότειναν ένα σύστημα πρόβλεψης της απορρόφησης συζευγμένο με μεμβράνη κυττάρων Caco-2 το οποίο ενσωματώνει και την φυσιολογική αλλαγή τιμών pH που παρατηρείται κατά την γαστρεντερική διάβαση των φαρμάκων (Σχήμα Α.5). Το φάρμακο διαλύεται σε έναν υποδοχέα που περιέχει 3 ml μέσου προσομοίωσης του στομάχου με τιμή pH=1, και με την βοήθεια μίας αντλίας, το διαλυμένο φάρμακο μεταφέρεται σε έναν άλλο περιέκτη με 3 ml μέσου προσομοίωσης pH=6. Το διάλυμα, με το ρυθμισμένο πλέον pH, μεταφέρεται σε καινούριο διαμέρισμα που βρίσκεται σε επαφή με μονοστοιβάδα κυττάρων Caco-2. Η ίδια διάταξη χρησιμοποιήθηκε και από τους Sugawara et al. (2005) μελετώντας επιπλέον και την επίδραση της αλλαγής του pH στο γαστρικό διαμέρισμα. Παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στη διαπέραση δύο διαφορετικών προϊόντων αλβενδαζόλης σε κανονικό και αυξημένο γαστρικό pH. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα από χορήγηση των σκευασμάτων αυτών σε κουνέλια. Δυστυχώς, όμως, η μέθοδος παρουσιάζει δυσκολίες όσον αφορά την καλλιέργεια των κυττάρων Caco-2, καθώς και την προσομοίωση σημαντικών

φυσιολογικών παραμέτρων διάλυσης, όπως ταχύτητες ροής, υδροδυναμικές συνθήκες και pH των χρησιμοποιούμενων μέσων.



Σχήμα Α.5: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης μελέτης διάλυσης και απορρόφησης που χρησιμοποιήθηκε από τους Kobayashi et al., 2001.

A.2.2 Διατάξεις μεγάλης κλίμακας

1. Πολυδιαμερισματικές διατάξεις που δεν λαμβάνουν υπόψη την εντερική απορρόφηση.

1.1 Διδιαμερισματικές διατάξεις - κλειστά συστήματα

Το 2004 οι Kostewicz et al. ανέπτυξαν την πρώτη πειραματική διάταξη που προσομοιώνει τη μεταφορά του φαρμάκου από το στομάχι στο άνω τμήμα του εντέρου. Το σύστημα απαρτίζεται από δύο διατάξεις περιστρεφόμενου περυγίου. Η πρώτη (διαμέρισμα-δότης) περιέχει 125 ml SGF_{fasted} προσομοιώνοντας το στομάχι και η δεύτερη (διαμέρισμα-δέκτης) περιέχει 500 ml FaSSIF ή FeSSIF προσομοιώνοντας το περιβάλλον στο δωδεκαδάκτυλο. Τα περιεχόμενα από το διαμέρισμα-δότη μεταφέρονται με την βοήθεια μίας περισταλτικής αντλίας στο διαμέρισμα-δέκτη με σταθερή ροή μεταξύ 0,5-9,0 ml/min. Και για τις τρεις ασθενώς βασικές ουσίες που εξετάστηκαν η διάταξη αυτή αποδείχθηκε αποτελεσματική στην πρόβλεψη του

βαθμού υπερκορεσμού και καθίζησής τους. Επίσης, βρέθηκε ότι ο ρυθμός γαστρικής κένωσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην καθίζηση των φαρμάκων. Τέτοιου είδους επιδράσεις εξετάστηκαν και με ένα μαθηματικό μοντέλο που προτάθηκε για την *in vitro* διάταξη γαστρικής μεταφοράς από τους Arnold et al. (2011).

Μειονεκτήματα του αρχικού μοντέλου, όπως η μηδενοταξική κινητική μεταφοράς από το στομάχι στο δωδεκαδάκτυλο, προσπάθησαν να εξαλείψουν οι Ruff et al. (2017). Προσομοιώθηκαν οι “μέσες” φυσιολογικές γαστρεντερικές συνθήκες ενώ εξετάστηκαν επίσης και ακραίες συνθήκες με εξεταζόμενο φάρμακο την κετοκοναζόλη. Για προσομοίωση της διαπεπτικής περιόδου χρησιμοποιήθηκε πρωτοταξική κινητική μεταφοράς, με χρόνο ημίσειας γαστρικής κένωσης 9 λεπτά. Η τεχνική αυτή, έδωσε αρκετά καλά αποτελέσματα. Όμως, όπως και στο αρχικό μοντέλο των Kostewicz et al., δεν συνυπολογιζόταν η διαδικασία απορρόφησης. Γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό κυρίως για φάρμακα με υψηλή διαπερατότητα, καθώς η γρήγορη απορρόφησή τους μέσω της εντερικής βλεννογόνου μπορεί να ελαττώσει σημαντικά την καθίζηση τους *in vivo*. Για αυτό τον λόγο, η διάταξη αυτή υπερεκτιμούσε την καθίζηση της κετοκοναζόλης. Για να ξεπεραστεί αυτή η έλλειψη, οι συγγραφείς επεξεργάστηκαν τα πειραματικά αποτελέσματα με ένα PBPΚ μοντέλο, που συνυπολόγιζε και την απορρόφηση. Με την προσέγγιση αυτή, βρέθηκε ότι η καθίζηση στο εντερικό περιβάλλον ήταν αμελητέα, οδηγώντας σε αρκετά ακριβή πρόβλεψη συγκεντρώσεων στο αίμα.

1.2 Πολυδιαμερισματικές διατάξεις - ανοιχτά συστήματα

Η διάταξη τεχνητού στομάχου-λεπού εντέρου (Artificial Stomach-Duodenum-ASD) αποτελείται από δύο διαμερίσματα που αντιπροσωπεύουν το στομάχι και το άνω τμήμα του λεπτού εντέρου. Το γαστρικό διαμέρισμα έχει μέγιστη χωρητικότητα 400 ml ενώ το εντερικό 50 ml (Carino et al., 2006). Η μεταφορά των περιεχομένων από το γαστρικό στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, καθώς και οι διάφορες εκκρίσεις στο στόμαχο και τον δωδεκαδάκτυλο ελέγχονται με μία σειρά αντλιών. Συνήθη χρησιμοποιούμενα μέσα προσομοίωσης αποτελούν το αραιωμένο διάλυμα HCl για το στομάχι και το FaSSIF για το έντερο. Οι αρχικοί όγκοι, οι ρυθμοί ροής των μέσων στα διαμερίσματα και οι ρυθμοί κένωσής τους, προσαρμόζονται κατάλληλα ανάλογα με τις εκάστοτε πειραματικές απαιτήσεις (π.χ διαπεπτική ή

περίοδος πέψης, προσομοίωση ανθρώπου ή σκύλου) (Carino et al., 2006; Carino et al., 2010; Bhattachar et al., 2011; Ding et al., 2015).

Το 2013 οι Tsume et al. πρότειναν μία τριδιαμερισματική διάταξη μελέτης διάλυσης, το «γαστρεντερικό προσομοιωτή» (Gastrointestinal Simulator- GIS). Η διάταξη απαρτίζεται από τρία διαμερίσματα που αντιπροσωπεύουν το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο και τη νήστιδα. Το 2014 οι Tagueuchi et al. αξιολόγησαν την χρησιμότητα του συστήματος αυτού στην πρόβλεψη της *in vivo* διάλυσης και καθίζησης φαρμάκων. Διαφορετικής σύστασης ρυθμιστικά διαλύματα, κατάλληλοι όγκοι και τιμές pH χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε διαμέρισμα για την αποτελεσματικότερη προσομοίωση των φυσιολογικών συνθηκών. Η κινητική μεταφοράς από το γαστρικό στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ήταν πρωτοταξική με χρόνο ημίσειας κένωσης 5-10 λεπτά. Τα πτερύγια είχαν προσαρμοστεί κατάλληλα ώστε, σε συγκεκριμένους χρόνους, να δίνουν μία ισχυρή ώθηση προσομοιώνοντας έτσι τις συσπάσεις που παρατηρούνται φυσιολογικά *in vivo*. Το λογισμικό Gastroplus χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί ο καταλληλότερος ρυθμός γαστρικής κένωσης που να ταιριάζει καλύτερα στα *in vivo* δεδομένα δύο BCS Class I φαρμάκων. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά στην πρόβλεψη της *in vivo* συμπεριφοράς των φαρμάκων. Το 2015 οι Matsui et al. χρησιμοποίησαν το GIS για να ελέγξουν την επίδραση του αυξημένου γαστρικού pH στη διάλυση φαρμάκων.

Μία ελαφρώς παραλλαγμένη εκδοχή του GIS, το mGIS, χρησιμοποιήθηκε το 2015 από τους Tsume et al. για την μελέτη της κινητικής απορρόφησης μίας βασικού χαρακτήρα ουσίας, της ντασατινίμπης. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα διάλυσης τόσο με διάταξη USP II όσο και με την mGIS, και τα αποτελέσματα, αφού συνδυάστηκαν με το λογισμικό Gastroplus, συγκρίθηκαν με δεδομένα από κλινικές μελέτες. Η διάταξη USP II έδειξε μηδενική καθίζηση, ενώ με την mGIS βρέθηκε τόσο υπερκορεσμός όσο και καθίζηση του φαρμάκου. Επίσης, η πρόβλεψη της συγκέντρωσης στο πλάσμα ήταν αρκετά ικανοποιητική με την νέα διάταξη. Η παρατηρούμενη υποεκτίμηση των AUC και C_{max} πιθανόν να οφείλεται σε υπερεκτίμηση του βαθμού καθίζησης λόγω αδυναμίας συνυπολογισμού της διαδικασίας απορρόφησης. Σε υπερεκτίμηση του βαθμού καθίζησης δύο ακόμα ασθενών βάσεων (διπυριδαμόλη και κετοκοναζόλη), πιθανόν λόγω απουσίας διαμερίσματος-απορρόφησης, οδήγησαν και τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την διάταξη GIS από τους Tsume et al. (2017).

2. Πολυδιαμερισματικές διατάξεις που λαμβάνουν υπόψη και την εντερική απορρόφηση

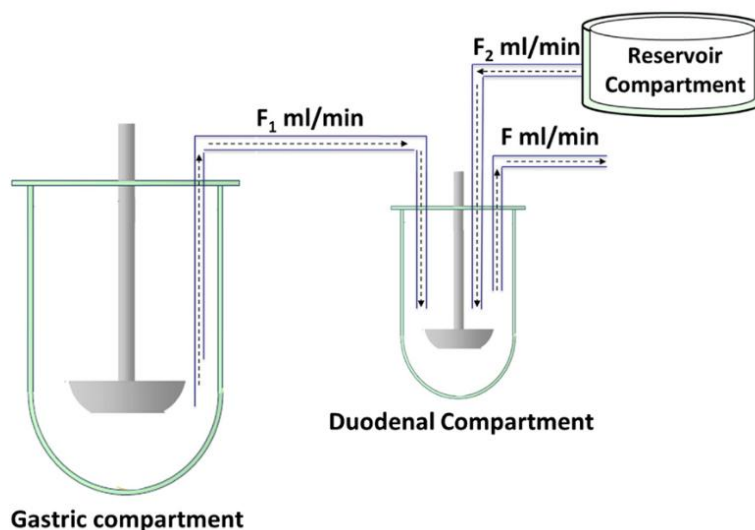
2.1 Με χρησιμοποίηση κατάλληλων ρυθμών ροής για συνυπολογισμό της γαστρεντερικής διάβασης και απορρόφησης

I. Τριδιαμερισματικές διατάξεις

Το 2012 οι Psachoulis et al. πρότειναν μία τριδιαμερισματική διάταξη για την μελέτη καθίζησης δύο φαρμάκων, της κετοконаζόλης και της διπυριδαμόλης. Τα τρία διαμερίσματα προσομοίωναν το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο και ένα διαμέρισμα δεξαμενή που σκοπό είχε να διατηρεί σταθερή τη σύσταση του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος. Στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετούνταν 60 ml μέσου τα οποία ανανεώνονταν κάθε 15 λεπτά. Η μεταφορά μεταξύ των διαμερισμάτων γινόταν με την βοήθεια μία περισταλτικής αντλίας. Η κινητική μεταφοράς από το γαστρικό στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ήταν πρωτοταξική με χρόνο ημίσειας γαστρικής κένωσης 15 λεπτά. Τα πειραματικά αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με τις ενδοαυλικές συγκεντρώσεις που είχαν βρεθεί όταν οι ουσίες είχαν χορηγηθεί σε υγιείς εθελοντές (Psachoulis et al., 2011). Όμως, με μελέτες XRPD βρέθηκε ότι η *in vitro* και *in vivo* μορφή της κετοконаζόλης που καθιζάνει, είναι διαφορετικές (*in vivo* άμορφη, *in vitro* κρυσταλλική). Τέλος, η διάταξη δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη, με αποτέλεσμα δυσκολία εφαρμογής της στην βιομηχανία.

Μία νέα διάταξη προσομοίωσης της γαστρεντερικής διάβασης για υψηλής διαπερατότητας APIs (Biorelevant Gastrointestinal Transfer system - BioGIT), προτάθηκε από τους Kourentas et al. (2016a). Και αυτή η διάταξη (Σχήμα A.6) αποτελείται από τρία διαμερίσματα (γαστρικό, δωδεκαδακτυλικό και διαμέρισμα – δεξαμενή) και έχει χρόνο ημίσειας γαστρικής κένωσης 15 λεπτά. Το διάλυμα από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα απομακρύνεται με σταθερό ρυθμό (11,6 ml/min), ενώ οι ρυθμοί μεταφοράς από το γαστρικό διαμέρισμα και το διαμέρισμα-δεξαμενή προς το δωδεκαδακτυλικό αλλάζουν κάθε 10 λεπτά. Οι ροές είναι τέτοιες, ώστε ο όγκος στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα να διατηρείται σταθερός καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Το γαστρικό διαμέρισμα περιέχει 250 ml FaSSGF, το δωδεκαδακτυλικό 40 ml FaSSIF ενώ στο διαμέρισμα-δεξαμενή τοποθετούνται διαφορετικής συγκέντρωσης συμπυκνωμένα FaSSIF, ώστε η τελική σύσταση στο

δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα να διατηρείται σταθερή. Οι ρυθμοί ροής και οι όγκοι των διαμερισμάτων έχουν υπολογιστεί βάσει ενδοαυλικών δεδομένων από κλινικές μελέτες.



Σχήμα Α.6: Διαγραμματική απεικόνιση της διάταξης BioGIT, όπου: F_1 και F_2 οι εισερχόμενες και F η εξερχόμενη από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ροή ($F=F_1+F_2$) (Kourentas et al., 2016a).

Η πρόβλεψη των ενδοαυλικών συγκεντρώσεων με τη χρήση της διάταξης BioGIT για τρία BCS Class II φάρμακα, ήταν σε πολύ καλή συσχέτιση με *in vivo* δεδομένα (Kourentas et al., 2016b; Kourentas et al., 2016c; Kourentas et al., 2016d). Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι το BioGIT είναι σχεδιασμένο να προβλέπει τις ενδοαυλικές συγκεντρώσεις δραστικών συστατικών υψηλής διαπερατότητας κατά την διαπεπτική περίοδο. Οπότε, για την εφαρμογή του για διαφορετικής διαπερατότητας ουσίες θα πρέπει να γίνουν και οι κατάλληλες τροποποιήσεις στους ρυθμούς ροής (Hens et al., 2014). Επίσης, αξιολογήθηκε η ενδο και δια-εργαστηριακή επαναληψιμότητα της διάταξης, μετρώντας τη συνολική και τη διαλυμένη ποσότητα καθώς και τον βαθμό υπερκορεσμού διαλυμάτων ρανιτιδίνης και κετοκοναζόλης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα. Μεγαλύτερες αποκλίσεις στην ολική και διαλυμένη ποσότητα εμφανίστηκαν στην περίπτωση που παρατηρήθηκε καθίζηση στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα. Για την κετοκοναζόλη, η μεταβλητότητα του βαθμού υπερκορεσμού της ανήλθε στο 32% και 43% κατά τον ενδο και δια-εργαστηριακό έλεγχο, αντίστοιχα (Barmpatsalou et al., 2017).

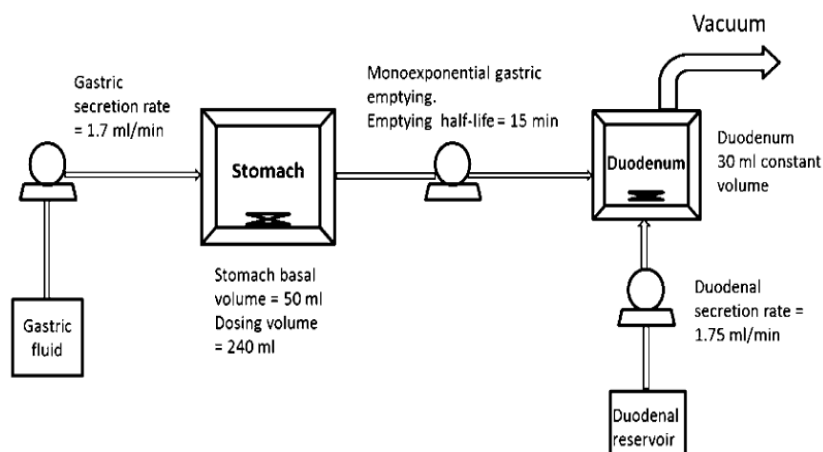
Άλλη μία μέθοδος, προτάθηκε από τους Selen et al. (2008), η οποία περιλαμβάνει και ένα διαμέρισμα προσομοίωσης της γενικής κυκλοφορίας (Selen A et al., 2008). Το FloVitro (Dow chemicals) αποτελείται από τρία διαμερίσματα (γαστρικό, δωδεκαδακτυλικό και γενική κυκλοφορία). Ο σκοπός του είναι η πρόβλεψη της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα, μετρώντας την συγκέντρωσή του στο διαμέρισμα που προσομοιώνει την γενική κυκλοφορία. Επίσης, έχει ελεγχθεί και η διαφοροποίηση στο προφίλ διάλυσης της δαναζόλης και της φουροσεμίδης σε χορήγησή τους κατά την διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης (Selen et al., 2011). Όμως, δεν έχουν παρουσιαστεί ακόμα αποτελέσματα από την εφαρμογή του για χαμηλής διαπερατότητας ουσίες και επιπλέον μελέτες χρειάζεται να πραγματοποιηθούν.

II. Τετραδιαμερισματικές διατάξεις

Το 2005 προτάθηκε από τους Gu et al. μία διάταξη τεσσάρων διαμερισμάτων αποτελούμενη από το γαστρικό, το δωδεκαδακτυλικό, ένα διαμέρισμα-δεξαμενή (για διατήρηση σταθερών συνθηκών στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα) καθώς και ένα διαμέρισμα-απορρόφησης (Gu et al., 2005). Το διαμέρισμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της απορρόφησης του φαρμάκου μέσω της εντερικής βλεννογόνου. Όλη η διάταξη διατηρούνταν σε θερμοκρασία 37 °C με σταθερό pH σε κάθε διαμέρισμα. Οι ρυθμοί μεταφοράς μεταξύ των διαμερισμάτων ήταν διαφορετικοί, ενώ οι όγκοι διατηρούνταν σταθεροί καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Εξετάστηκε η καθίζηση δύο ασθενών βάσεων, της κινναριζίνης και της διπυριδαμόλης. Η διάταξη προέβλεπε ικανοποιητικά την ενδοαυλική καθίζηση τους συγκρινόμενη με *in vivo* δεδομένα. Η διάταξη αυτή, παρέχει την δυνατότητα ενσωμάτωσης της διαδικασίας απορρόφησης σε ένα σύστημα διάλυσης και παράλληλα, καθιστά δυνατή τη μελέτη της κινητικής καθίζησης και ουσιών με διαφορετικούς ρυθμούς απορρόφησης. Όμως, δυστυχώς, παραμένει δύσκολη η ρύθμιση του ρυθμού απορρόφησης ώστε να ανταποκρίνεται στις *in vivo* συνθήκες.

Οι Mitra & Fadda (2014), πρότειναν ένα σύστημα βασισμένο στο μοντέλο που προτάθηκε από τους Carino et al., το Simulated Stomach Duodenum- SSD (Σχήμα Α.7). Εξετάστηκε η ενδοαυλική συμπεριφορά μίας λιπόφιλης ασθενούς βάσης, της διπυριδαμόλης, σε διάφορες δόσεις και με την παρουσία διαφόρων συνήθη χρησιμοποιούμενων επιφανειοδραστικών ουσιών. Οι όγκοι στο γαστρικό και το

δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα βασίστηκαν σε προγενέστερες κλινικές μελέτες. Στο γαστρικό διαμέρισμα έχουμε 50 ml υπολειπόμενο όγκο και η δόση χορηγείται μαζί με 240 ml νερό, ενώ στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα έχουμε 30 ml μέσου προσομοίωσης. Το στομάχι τροφοδοτείται συνεχώς με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό (ροή 1,7 ml/min) για προσομοίωση των γαστρικών εκκρίσεων, ενώ το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τροφοδοτείται από το διαμέρισμα-δεξαμενή για διατήρηση σταθερού όγκου και σύστασης (ροή 1,75 ml/min). Η γαστρική κένωση ακολουθούσε πρωτοταξική κινητική με χρόνο ημίσειας κένωσης 15 λεπτά. Ο ρυθμός ροής από το γαστρικό στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα μειωνόταν εκθετικά με τον χρόνο, μέχρι επίτευξης του υπολειπόμενου όγκου στο γαστρικό διαμέρισμα οπότε η ροή παρέμενε σταθερή και ίση με 1,7 ml/min. Η διάταξη SSD έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα στην πρόβλεψη της κινητικής υπερκορεσμού της διπυριδαμόλης συγκρινόμενη με *in vivo* δεδομένα. Όμως, είναι δύσκολη η ευρεία χρήση της, καθώς δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη. Επίσης, δεν έχουν γίνει οι κατάλληλες αλλαγές των ρυθμών ροής για προσομοίωση απορρόφησης χαμηλής διαπερατότητας APIs και η ανάδευση στα διαμερίσματα γίνεται με μαγνητικούς αναδευτήρες (200 rpm), οδηγώντας σε αποκλίσεις από τις φυσιολογικές υδροδυναμικές συνθήκες. Περισσότερα πειράματα με επιπλέον ουσίες, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για να εξεταστεί καλύτερα η αποτελεσματικότητα της μεθόδου στην πρόβλεψη της ενδοαυλικής συμπεριφοράς δραστικών ουσιών.



Σχήμα Α.7: Διαγραμματική απεικόνιση της διάταξης SSD (Simulated Stomach Duodenum) (Mitra & Fadda, 2014).

Το σύστημα TIM-1 είναι ένα δυναμικό σύστημα προσομοίωσης του γαστρεντερικού αυλού που αναπτύχθηκε από τους Blanquet et al. (2004), για μελέτη ενδοαυλικής συμπεριφοράς μορίων τόσο κατά την διαπεπτική περίοδο όσο και κατά την περίοδο πέψης. Απαρτίζεται από τέσσερα σειριακά διαμερίσματα που προσομοιώνουν το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα και τον ειλεό αντίστοιχα. Η αρχική του χρήση ήταν για μελέτη ενδοαυλικής συμπεριφοράς θρεπτικών συστατικών, όμως έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για εφαρμογή του και στη μελέτη φαρμάκων. Δυστυχώς, η πολυπλοκότητα του συστήματος και ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται για να στηθεί η διάταξη αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες χρήσης του. Πρόσφατα οι Van Den Abeele et al. (2017), χρησιμοποίησαν μία παραλλαγμένη εκδοχή του συστήματος TIM-1 (TIMagc) για την μελέτη της ενδοαυλικής συμπεριφοράς της δικλοφαινάκης τόσο κατά την περίοδο πέψης όσο και κατά την διαπεπτική περίοδο. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με ενδοαυτικά δεδομένα και συγκεντρώσεις πλάσματος αίματος από υγιείς εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκε δισκίο δικλοφαινάκης. Η διάταξη προέβλεπε αρκετά ικανοποιητικά την ενδοαυλική και συστηματική διάθεση του φαρμάκου. Όμως, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την απόδειξη της αποτελεσματικότητας του συστήματος TIM-1 στην πρόβλεψη της καθίζησης ασθενών βάσεων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου.

2.2 Με χρήση κυτταρικών σειρών Caco-2, διαφασικών μέσων και μεμβρανών για την προσομοίωση της διαδικασίας απορρόφησης

Το 1999 οι Ginski et al. πρότειναν ένα σύστημα που προσδιόριζε ταυτόχρονα τις διαδικασίες διάλυσης και απορρόφησης στο γαστρεντερικό σύστημα. Το σύστημα αποτελούνταν από μία διάταξη διάλυσης συνδεδεμένη με ένα κύτταρο διάχυσης. Το φάρμακο διαλύεται στο διαμέρισμα διάλυσης, και στη συνέχεια, αφού διέλθει από ηθμούς μεγέθους πόρων 10 μm , μεταφέρεται με τη βοήθεια μίας αντλίας στο διαμέρισμα-δότη που περιέχει και την μονοστοιβάδα κυττάρων Caco-2. Η τεχνική αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως μία πρώτη προσπάθεια σύζευξης της διαδικασίας διάλυσης και της διαδικασίας απορρόφησης μέσω μονοστοιβάδας κυττάρων Caco-2. Βέβαια, απαιτείται ακόμα έλεγχος και αλλαγή αρκετών παραγόντων για να μπορέσει το συγκεκριμένο σύστημα να αντικατοπτρίζει επαρκώς την *in vivo* απορρόφηση.

Στην ίδια λογική βασίστηκε και το σύστημα που αναπτύχθηκε το 2003 από τους Kataoka et al. που αποτελούνταν από δύο διαμερίσματα που χωρίζονται με μία μονοστοιβάδα κυττάρων Caco-2. Το σύστημα αυτό διάλυσης-διαπεράσεως (dissolution-permeation system-D/P) είχε ως μέσο διάλυσης και στα δύο διαμερίσματα ισοτονικό διάλυμα αλάτων Hanks και η ανάδευση πραγματοποιούνταν με μαγνητικούς αναδευτήρες. Το 2012 οι Kataoka et al. προσπάθησαν να βελτιώσουν την διάταξη χρησιμοποιώντας μέσα διάλυσης που ήταν περισσότερο κοντά στα φυσιολογικά (ισότονο διάλυμα αλάτων Hanks με ταυροχολικό οξύ και λεκιθίνη). Αν και η μέθοδος αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στην διαλογή της καταλληλότερης φαρμακομορφής κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης ενός φαρμάκου, απαιτούνται αρκετές ακόμα τροποποιήσεις ώστε να προσομοιώνει επαρκώς τις *in vivo* συνθήκες.

Σε μία προσπάθεια να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, οι Motz et al. (2007) πρότειναν ένα καινούριο σύστημα ταυτόχρονης μελέτης διαλυσης-διαπερατότητας. Η διάταξη αποτελείται από μία συσκευή διάλυσης USP IV συνδεδεμένη με μία συσκευή προσδιορισμού της διαπερατότητας. Η διάταξη διαπεράσεως αποτελείται από δύο διαμερίσματα που συνδέονται μέσω μίας μονοστοιβάδας κυττάρων Caco-2. Οι ρυθμοί ροής στην διάταξη USP IV έπρεπε να ρυθμιστούν κατάλληλα ώστε να μην καταστραφούν τα Caco-2 κύτταρα. Ως μέσο διάλυσης για μία πρώτη εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της διάταξης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Krebs. Αν και η χρήση των κυττάρων Caco-2 είναι αρκετά βοηθητική στη μελέτη της διαπερατότητας, εμφανίζει και αρκετούς περιορισμούς (Hidalgo et al., 1989; Artursson & Karlsson, 1991; Yamashita et al., 1997; Sun et al., 2008). Συγκεκριμένα, η καλλιέργειά τους είναι αρκετά χρονοβόρα, δεν προσομοιώνουν επαρκώς την παρακυττάρια μεταφορά (λόγω ισχυρότερων συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων) και εμφανίζεται μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των διαφορετικών καλλιεργειών.

Ένας άλλος τρόπος προσδιορισμού της διαπερατότητας αποτελεί η χρήση στοιβάδας οργανικού διαλύτη (Thu Hoa et al., 1996; Grundya et al., 1997; Gabriëls & Plaizier-Vercammen, 2004). Η ποσότητα ουσίας που λαμβάνεται από την οργανική στοιβάδα είναι αντιπροσωπευτική της διαθέσιμης προς απορρόφηση ποσότητας φαρμάκου. Το 2009 οι Vagani et al., ανέπτυξαν ένα τέτοιο σύστημα συνδυάζοντας την διάταξη διάλυσης USP IV με διφασικά μέσα. Συγκεκριμένα, το φαρμακευτικό προϊόν τοποθετούνταν στη διάταξη συνεχούς ροής και τα μέσα διατηρούνταν σε

διατάξεις USP II σε θερμοκρασία 37°C. Το ίδιο σύστημα χρησιμοποιήθηκε και το 2010 από τους Shi et al. Τα αποτελέσματα έδωσαν αρκετά καλή συσχέτιση με *in vivo* δεδομένα.

Το 2017 οι Tsume et al. συνδύασαν τον «γαστρεντερικό προσομοιωτή» (GIS) με διαφασικά μέσα, για να ελέγξουν αν η προσθήκη της οργανικής στοιβάδας θα βελτιώνει την ικανότητα πρόβλεψης της συγκέντρωσης στο πλάσμα δύο ασθενώς βασικών φαρμάκων, της ραλοξιφαίνης και της κετοκοναζόλης. Πράγματι, η μέθοδος αυτή οδήγησε σε βραδύτερη μείωση της συγκέντρωσης στο εντερικό περιβάλλον, οδηγώντας έτσι σε μία καινούρια τιμή σταθεράς καθίζησης. Η ενσωμάτωση των αποτελεσμάτων αυτών σε φυσιολογικά φαρμακοκινητικά μοντέλα με τη βοήθεια του λογισμικού Gastroplus, οδήγησε σε βελτιστοποίηση της *in vivo* πρόβλεψης για την κετοκοναζόλη.

Οι Hate et al., την ίδια χρονιά, ανέπτυξαν μία νέα διάταξη μελέτης διάλυσης συζευγμένη με μία μεγάλου εμβαδού μεμβράνη. Έτσι, προσομοιώνεται η μεγάλη έκταση απορρόφησης που υπάρχει φυσιολογικά στον οργανισμό. Η διάταξη αποτελείται από τρία διαμερίσματα (διαμέρισμα-δότη, διαμέρισμα δεξαμενή και διαμέρισμα-δέκτη). Η μεταφορά του διαλύματος από το διαμέρισμα-δότη στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης γίνεται με τη βοήθεια αντλίας και στην εξωτερική πλευρά της μεταφέρεται ρυθμιστικό διάλυμα από το διαμέρισμα-δεξαμενή. Η ποσότητα φαρμάκου που διαχέεται μέσω της μεμβράνης μεταφέρεται στη συνέχεια στο διαμέρισμα-δέκτη, ενώ το υγρό που είχε έρθει από το διαμέρισμα-δότη επιστρέφει σε αυτό. Εξετάστηκε η συμπεριφορά της ασθενούς βάσεως νεβιραπίνη. Στο διαμέρισμα-δότη χρησιμοποιήθηκε αρχικά διάλυμα 0,1 M HCl για 30 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα 0.17 M Na₂HPO₄ για ρύθμιση του pH στο 6,5 και συνδέθηκε το σύστημα μελέτης απορρόφησης. Παρατηρήθηκε ταχεία καθίζηση της ουσίας με την ρύθμιση του pH=6,5. Όταν, όμως, χρησιμοποιήθηκε αναστολέας καθίζησης HPMC-AS, δεν παρατηρήθηκε καθίζηση στο διαμέρισμα-δοτή μέχρι και για 160 λεπτά, ενώ οι συγκεντρώσεις στο διαμέρισμα-δέκτη ήταν αυξημένες. Τα προφίλ διάλυσης με και χωρίς σύζευξη με τη μεμβράνη απορρόφησης δεν εμφάνιζαν μεγάλες διαφορές. Επιπλέον μελέτες απαιτούνται για την απόδειξη της χρησιμότητάς του.

A.3 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν οι κάτωθι:

A.3.1 Σχεδιασμός και εφαρμογή της διάταξης *μBioGIT* – Σύγκριση με το *BioGIT*

Ο πρώτος στόχος της εργασίας ήταν ο σχεδιασμός και η εφαρμογή της διάταξης *μBioGIT*. Η διάταξη αυτή βασίζεται στην διάταξη προσομοίωσης γαστρεντερικής διάβασης που προτάθηκε το 2016 από τους Kourentas et al. Αποτελεί εφαρμογή της αρχικής διάταξης αλλά σε μικρή κλίμακα, με χρησιμοποιούμενους όγκους μέσω διάλυσης και εφαρμοζόμενες ροές μεταξύ των διαμερισμάτων, στο μισό των αρχικών, εξοικονομώντας έτσι αρχικές ποσότητες δραστικών ουσιών και διαλυμάτων. Για τον απόδειξη της ισοδυναμίας της με την αρχική διάταξη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με ίδιες ουσίες και στις δύο διατάξεις. Οι χρησιμοποιούμενες ουσίες ήταν: διάλυμα ρανιτιδίνης (δόσης 300 mg) (BCS Class III), διάλυμα κετοκοναζόλης (δόσης 300 mg) (BCS Class II) και δισκία πιογλιταζόνης (δόσης 15 mg) (BCS Class II).

Εξετάστηκε η ισοδυναμία των δύο διατάξεων, με βάση τις τιμές διαλυμένης και ολικής ποσότητας ανά όγκο (μg/ml) για τις τρεις ουσίες και στις δύο διατάξεις σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας,

A.3.2 *In vitro* εκτίμηση της συνολικής ποσότητας και της συγκέντρωσης στον ανώτερο εντερικό αυλό στερεών διασπορών των δραστικών ουσιών A και B με την διάταξη *BioGIT*.

Μελετήθηκαν προϊόντα στερεών διασπορών των δραστικών ουσιών A και B σε φορείς HPMC-AS και HPMC, αντίστοιχα, με περιεκτικότητα σε δραστική ουσία 20%. Εκτιμήθηκε *in vitro* η ποσότητα και η συγκέντρωση των φαρμάκων στον ανώτερο εντερικό αυλό με τη διάταξη *BioGIT*.

Στον Πίνακα A.2 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο δραστικών ουσιών (δεδομένα αρχείου Merck).

Πίνακας Α.2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δραστικών ουσιών Α και Β (δεδομένα αρχείου Merck).

Ιδιότητες		Δραστική ουσία Α (κρυσταλλικό API)	Δραστική ουσία Β (άμορφο API)
pK_a		9,5	4,85 και 5,87
logD (σε pH = 7)		2,3	2,84
Διαλυτότητα	pH ≤ 2,0	-	> 8 mg/ml
	pH = 3,5	-	1,02 mg/ml
	pH = 4,1	-	0,031 mg/ml
	pH ≥ 4,7	-	< 0,001 mg/ml
	2 < pH < 10	3-5 µg/ml	-
	FaSSIV-V ₁	5-10 µg/ml	-
Διαπερατότητα		Υψηλή	Μέτρια/Χαμηλή

A.3.3 Σύγκριση διάλυσης και μεταφοράς φαρμάκων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου όταν στο δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον *in vitro* περιέχεται FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II ή αναρροφηθέντα ανθρώπινα εντερικά υγρά (HIF_{fasted}).

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των χρησιμοποιούμενων μέσων προσομοίωσης υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες μελέτες διαλυτότητας σε HIF_{fasted} και FaSSIF στη βιβλιογραφία για διάφορα φάρμακα (Augustjins et al., 2014). Όμως, δεν είναι πολλές οι μελέτες διάλυσης σε HIF_{fasted} συγκριτικά με μέσα προσομοίωσης (Litou et al., 2017).

Έγινε προσπάθεια σύγκρισης της διάλυσης και της μεταφοράς ουσιών *in vitro* όταν ως μέσο που προσομοιώνει το δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον χρησιμοποιείται το FaSSIF ή όταν χρησιμοποιούνται HIF_{fasted}. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μίας νέας μεθοδολογίας, μη συνεχούς μεταφοράς των γαστρικών περιεχομένων, δηλαδή με διάβαση που πραγματοποιείται κατά βήματα. Η σύγκριση έγινε για ένα μόνο χρονικό “παράθυρο” (ένα βήμα), αυτό των 20-30 λεπτών (“20-30 min one-step”). Η διάταξη βασίστηκε σε αυτή που προτάθηκε το 2012 από τους Psachoulis et al. Λόγω περιορισμένου όγκου αναρροφηθέντων δωδεκαδακτυλικών υγρών, οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι και οι εφαρμοζόμενες ροές μεταξύ των διαμερισμάτων ελαττώθηκαν. Οι ουσίες που εξετάστηκε η διάλυσή τους στα δύο μέσα με τη νέα διάταξη είναι η πιογλιταζόνη, η δραστική ουσία Α και η δραστική ουσία Β.

A.3.4 Αξιολόγηση της κατανομής του μεγέθους σωματιδίων στα δείγματα από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα για την δραστική ουσία B σε πειράματα με τις διατάξεις BioGIT και “20-30 min one-step”.

Το μέγεθος των σωματιδίων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία διάλυσης ενός φαρμάκου ενδοαυλικά, και κατ’ επέκταση στην δράση του. Μία προσπάθεια προσδιορισμού της κατανομής μεγέθους σωματιδίων για δύο δόσεις της άμορφης στερεής διασποράς της δραστικής ουσίας B (20% API, 80% HPMC), έγινε με διαδοχικές διηθήσεις των δειγμάτων από ηθμούς διαφορετικού μεγέθους πόρων (1 μm , 0,45 μm και 0,1 μm).

Έτσι, αξιολογήθηκε η αλλαγή της διαμέτρου των στερεών σωματιδίων που υπάρχουν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης BioGIT κατά την διάρκεια του πειράματος, αλλά και συγκριτικά, η επίδραση των δύο διατάξεων (BioGIT και “20-30 min one-step”) και των δύο μέσων διάλυσης (FaSSIF και HIF_{fasted}) στο μέγεθος των αδιάλυτων στερεών.

B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

B.1 Όργανα-Υλικά

- Αναδευτήρας περιδίνησης (vortex) model MS3 minishaker, IKA[®] works, Inc., (Η.Π.Α.).
- Ανακινούμενο και θερμοστατούμενο υδατόλουτρο UNITRONIC OR,J.P. SELECTA, s.a. (Ισπανία).
- Αναλυτικός ζυγός Kern ABT 120-5 DNM, Kern & Sohn GmbH (Γερμανία).
- Διάταξη μικρού περιστρεφόμενου πτερυγίου Erweka[®] DT 6 (Γερμανία).
- Διπλότοιχος, ρινο-γαστρο-δωδεκαδακτυλικός σωλήνας Freka[®] Trelumina, CH/FR 16/9, 150 cm, Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Γερμανία), που φέρει στο τέλος του μία ελαστική προεξοχή. Η εξωτερική και εσωτερική διάμετρος για τον γαστρικό σωλήνα είναι 5,3 και 4,1 mm, ενώ για τον δωδεκαδακτυλικό 2,9 και 1,9 mm, αντίστοιχα. Μία σειρά από οπές διαμέτρου 13,5-23,5 cm πάνω από την ελαστική προεξοχή ανοίχτηκε για την αναρρόφηση δειγμάτων από την περιοχή του συνδέσμου του Treitz.
- Ηθμοί διήθησης ανόργανων υλικών Anotop[™], 10 mm, 0,1 μm, Whatman[™] (Γερμανία).
- Ηθμοί διήθησης αναγεννημένης κυτταρίνης (RC) Titan[®] 3 Syringe FILTER LT BROWN, 17 mm, 0,45 μm, Thermo (Η.Π.Α.).
- Ηθμοί διήθησης αναγεννημένης κυτταρίνης (RC) Titan[®] 3 Syringe FILTER GRANITE, 17 mm, 0,2 μm, Thermo (Η.Π.Α.).
- Θερμαινόμενη και ψυχόμενη φυγόκεντρος Universal 320 R, Hettich Zentrifugen (Γερμανία).
- Λουτρό υπερήχων Elmasonic S 100H, Elma, [Singen (Hohentwiel), Γερμανία].
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης model RH basic, IKA[®] works, Inc, (Η.Π.Α.).
- Πεχάμετρο Scott, model CG842, SCOTT GLAS (Γερμανία).
- Προστήλη BDS C18 (10 x 4,6 mm, 5 μm) Hypersil[®], ThermoQuest Inc. (Η.Π.Α.).
- Στήλη BDS C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) Hypersil[®], ThermoQuest Inc. (Η.Π.Α.).
- Στήλη Fortis C18 (150 x 3 mm, 5 μm) Fortis[™] Technologies Ltd. (Ηνωμένο Βασίλειο).

- Σύριγγες πλαστικές 5, 10 και 20 ml, BMDI (Ηνωμένο Βασίλειο).
- Σύριγγες υάλινες 5 και 10 ml, FORTUNA[®] OPTIMA[®], Poulsen & Graf GmbH (Wertheim, Γερμανία).
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία Spectra System P1000, αυτόματο δειγματολήπτη AS3000, ανιχνευτή UV/Vis Spectra system UV2000, σύστημα ελέγχου Spectra system controller SN4000 και λογισμικό Chromquest, Thermoquest Inc. (Η.Π.Α).
- Τρι-διαυλική περισταλτική αντλία Reglo ICC, ISM 4308, Ismatec S.A (Ελβετία) με σωληνάκια Tygon R3607, εσωτερικής διαμέτρου 1,65 mm, Ismatec (Γερμανία).
- Υπερφυγόκεντρος (Ultra-Pro 80, Serial No. 9802745, Sorvall, USA).

B.2 Δραστικές ουσίες και φαρμακοτεχνικές μορφές

- Κετοконаζόλη (KCZ), lot# 0712003723, καθαρότητας 100%, Janssen Cork, Janssen Pharmaceutical Ltd (Δημοκρατία της Ιρλανδίας).
- Ρανιτιδίνη υπό την μορφή του υδροχλωρικού άλατος (RNT), batch no. 12071510107, καθαρότητας 98,5% κατ' ελάχιστο, Unipharma (Ελλάδα).
- Πιογλιταζόνη υπό την μορφή του υδροχλωρικού άλατος (PIO), lot:U26K, καθαρότητας 99 % κατ' ελάχιστο, Matrixscientific (Columbia,U.S.A).
- Δισκία άμεσης αποδέσμευσης πιογλιταζόνης 15 mg, lot# FX7022 (Sandoz, GmbH, Αυστρία).
 - Σύσταση: 15 mg υδροχλωρικού άλατος πιογλιταζόνης, μονοϋδρική λακτόζη, υδροξυ – προπυλο - κυτταρίνη, στεατικό μαγνήσιο, carmellose calcium.
- Κρυσταλλική σκόνη δραστικής ουσίας A (Merck,U.S.A).
- Άμορφη σκόνη δραστικής ουσίας B (Merck,U.S.A).
- Άμορφη στερεή διαφορά δραστικής ουσίας A (20%) σε HPMC-AS (80%), (Merck,U.S.A).
- Άμορφη στερεή διαφορά δραστικής ουσίας B (20%) σε HPMC (80%), (Merck,U.S.A).

B.3 Αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich[®] (Η.Π.Α).

- Νερό βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich® (Η.Π.Α).
- Μη ανθρακούχο εμφιαλωμένο επιτραπέζιο νερό Κρήτης®, (Ελλάδα).
- Μεθανόλη βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich® (Η.Π.Α).
- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο διυδρικό ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), lot # SZBG0770H, 98-100.5% βαθμού καθαρότητας (Γερμανία).
- Υδροξείδιο του νατρίου (σφαιρίδια) (NaOH), lot # SZBF3240V, $\geq 98\%$ αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Sigma-Aldrich® (Δανία).
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl), 37% v/v ,αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Fisher® (Η.Π.Α).
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl), lot# SZBF2750V, $\geq 99,5\%$ καθαρότητας, Sigma-Aldrich® (Δανία).
- Όξινο φωσφορικό νάτριο διυδρικό ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), lot # K42147380 113, $\geq 99,5\%$ καθαρότητας, Merck (Γερμανία).
- Πενίνη χοίρου, 132 unit/mg στερεού και 722 unit/mg πρωτεΐνης, lot # SLBN1170V, Sigma-Aldrich® (St Louis, Missouri, Η.Π.Α).

B.4 Τεχνικές ανάλυσης

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών εφαρμόστηκαν μέθοδοι ανάλυσης HPLC. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι προσδιορισμού για κάθε μία από τις εξεταζόμενες δραστικές ουσίες παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα 1.

B.5 Κλινική μελέτη

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Νοσοκομείο «Κοργιαλένιο-Μπενάκειο-Ε.Ε.Σ», μετά από αδειοδότηση από το Διοικητικό Συμβούλιο και από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου του Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού (ΝΕΕΣ) (Παράρτημα 2). Αφορά μελέτη μίας φάσης, στην οποία συμμετείχαν 10 υγιείς άρρενες εθελοντές ηλικίας 18-48 ετών, εκ των οποίων δύο συμμετείχαν δυο φορές. Οι αναρροφήσεις υγρών περιεχομένων από το τέλος του δωδεκαδακτύλου, πραγματοποιήθηκαν κατά τη διαπεπτική περίοδο, μετά από χορήγηση στο στόμαχο 240 ml επιτραπέζιου νερού Κρήτης®.

B.5.1 Εθελοντές

- **Κριτήρια συμμετοχής**

- i. Ο ενδιαφερόμενος θα πρέπει να είναι άνδρας ηλικίας 18-50 χρόνων και να επιθυμεί να συμμετάσχει στη μελέτη, υπογράφοντας το σχετικό έγγραφο συγκατάθεσης για εθελοντική συμμετοχή.
- ii. Το σωματικό του βάρος δεν θα πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από $\pm 20\%$ του ιδανικού του βάρους, όπως αυτό καθορίζεται από τους πίνακες Metropolitan.
- iii. Ο υποψήφιος εθελοντής θα πρέπει να κριθεί υγιής μετά από μία σειρά αιματολογικών εξετάσεων, στην οποία θα αξιολογηθούν η λειτουργία των νεφρών και του ήπατος, τα επίπεδα ηλεκτρολυτών και λιπιδίων αίματος, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του αίματος, καθώς και η παρουσία αντιγόνων και αντισωμάτων που υποδηλώνουν μόλυνση από ιούς ηπατίτιδας ή HIV.
- iv. Ο υποψήφιος εθελοντής θα πρέπει να μπορεί να απέχει από το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών και τη λήψη μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων (ΜΗΣΥΦΑ) για τουλάχιστον (3) μέρες προ της ημέρας διεξαγωγής της μελέτης.

- **Κριτήρια αποκλεισμού**

- i. Ύπαρξη σοβαρού προβλήματος υγείας (καρδιαγγειακού, παγκρεατικού, ηπατικού, θυρεοειδικού κ.λ.π) ή/και χρόνιων παθήσεων, τα οποία απαιτούν μακρόχρονη χρήση συνταγογραφούμενων φαρμάκων.
- ii. Ιστορικό ασθένειας του γαστρεντερικού συστήματος (όπως έλκος, αίσθημα καύσου στην περιοχή του στομάχου κ.α).
- iii. Λήψη κάποιου φαρμάκου για ερευνητικούς σκοπούς ή συμμετοχή σε άλλη κλινική μελέτη λιγότερο από 30 μέρες πριν την έναρξη της συγκεκριμένης κλινικής μελέτης.
- iv. Χρήση φαρμάκων που επηρεάζουν την λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος (όπως αντιόξινα, υπακτικά, καθαρτικά κα) για διάστημα μικρότερο των 30 ημερών προ της διεξαγωγής της συγκεκριμένης κλινικής μελέτης.
- v. Μη κανονικές εντερικές συνήθειες.
- vi. Δυσκολίες κατάποσης.
- vii. Εάν ο ενδιαφερόμενος δεν κριθεί υγιής μετά τις αιματολογικές εξετάσεις στις οποίες οφείλει να υποβληθεί.

B.5.2 Χαρακτηριστικά εθελοντών

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών που συμμετείχαν στη παρούσα κλινική μελέτη παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα Β.1.

Πίνακας Β.1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά υγιών εθελοντών που συμμετείχαν στη παρούσα κλινική μελέτη.

Εθελοντής (κωδικός)	Ηλικία (Ετη)	Βάρος (kg)	Ύψος (cm)	Δείκτης Μάζας Σώματος –BMI (kg/m ²)	% απόκλιση από κανονικό BMI
SIA-1	24	82	187	23,45	3,45
SIA-3	20	70	175	22,86	2,86
SIA-4	40	103	185	30,09	10,09
SIA-5	18	85	180	26,23	6,23
SIA-6	37	60	176	19,37	-0,63
SIA-7	20	78	176	25,18	5,18
SIA-8	36	59	169	20,66	0,66
SIA-9	25	79	182	23,85	3,85
SIA-10	48	92	187	26,31	6,31
SIA-11	30	70	167	25,10	5,10

B.5.3 Πρωτόκολλο

Ο εθελοντής όφειλε να απέχει από την λήψη οιοπονευματώδων ποτών και μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων για τουλάχιστον τρεις (3) ημέρες πριν από την ημέρα διεξαγωγής της κλινικής μελέτης. Η λήψη τροφής διακόπηκε 12 ώρες πριν την έναρξη της πειραματικής ημέρας, ενώ η κατανάλωση νερού επιτρεπόταν *ad libitum*. Με την άφιξή του στο νοσοκομείο, γινόταν μία σύντομη εξέταση από γαστρεντερολόγο για εξακρίβωση της κατάστασης της υγείας του. Επίσης, καλούνταν να απαντήσει σε κατάλληλο ερωτηματολόγιο για να ελεγχθεί η συμμόρφωσή του προς το πρωτόκολλο (Παράρτημα 2). Στη συνέχεια, άρχιζε η διαδικασία τοποθέτησης πλαστικού διπλότοιχου ρινο-γαστρο-δωδεκαδακτυλικού καθετήρα, υπό συνεχή ακτινοσκοπικό έλεγχο.

- **Αναρροφήσεις δειγμάτων από το δωδεκαδάκτυλο**

Η τοποθέτηση του καθετήρα γίνεται υπό συνεχή ακτινοσκοπικό έλεγχο για να διασφαλιστεί η σωστή εισαγωγή του, με τη “γαστρική πύλη” να βρίσκεται στο άντρο του στομάχου και τη “δωδεκαδακτυλική πύλη” να είναι κοντά στη νηστιδοδωδεκαδακτυλική καμπή (σύνδεσμος του Treitz) (Παράρτημα 3). Μετά την εισαγωγή του καθετήρα, ο εθελοντής τοποθετείται σε ημι-ύπτια θέση και λαμβάνονται δείγματα τόσο από τον στόμαχο όσο και από το δωδεκαδάκτυλο, για επιβεβαίωση της σωστής θέσης του καθετήρα. Στη συνέχεια, ακολουθεί χορήγηση 240 ml επιτραπέζιου νερού Κρήτης® (σε θερμοκρασία δωματίου) στο στόμαχο μέσω της γαστρικής πύλης. Η δειγματοληψία από το δωδεκαδάκτυλο πραγματοποιείται στα 5, 10, 20, 30, 40, 50 και 60 min μετά την χορήγηση του νερού στο στόμαχο, με πλαστικές σύριγγες χωρητικότητας 5 και 10 ml. Τα αναρροφηθέντα δείγματα μεταφέρονται σε πλαστικούς περιέκτες και μετράται αμέσως το pH τους (Παράρτημα Π.4). Οι όγκοι και οι τιμές pH των δειγμάτων που αναρροφήθηκαν από κάθε εθελοντή στους καθορισμένους χρόνους δειγματοληψίας παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες Β.2 και Β.3.

Όλα τα δείγματα φυλάσσονται αρχικά στους 0 °C και, στη συνέχεια, μεταφέρονται σε υπερκαταψύκτη, στους -70 °C. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας δειγματοληψιών, ο καθετήρας αφαιρείται από ειδικό γαστρεντερολόγο, και μετά από μία σύντομη εξέταση, για την εξακρίβωση της καλής κατάστασης της υγείας του, ο εθελοντής είναι ελεύθερος να αποχωρήσει από το νοσοκομείο. Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, οι ερευνητές βρίσκονται σε συνεχή 24ωρη τηλεφωνική επικοινωνία με τον εθελοντή για έλεγχο τυχόν παρενεργειών από την όλη διαδικασία.

Πίνακας Β.2: Όγκοι (ml) αναρροφηθέντων δειγμάτων από το δωδεκαδάκτυλο για κάθε εθελοντή σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας.

	Χρόνος (min)							
Εθελοντής	5	10	20	30	40	50	60	Σύνολο
SIA-1A	8,5	5,0	5,5	4,0	6,5	4,5	7,0	41,0
SIA-3A	6,5	4,0	5,0	5,5	7,5	6,5	5,5	40,5
SIA-4A	5,0	4,0	2,5	7,5	4,0	4,0	3,0	30,0
SIA-5A	3,5	7,5	5,5	1,0	-	3,3	1,0	21,8
SIA-6A	8,0	8,0	5,0	8,0	1,5	5,5	1,0	37,0
SIA-7A	8,0	7,0	5,0	3,9	-	-	-	23,9
SIA-8A	7,5	7,5	4,0	5,5	2,0	5,5	2,0	34,0
SIA-8B	8,0	8,0	6,0	6,0	6,0	9,5	4,0	47,5
SIA-9A	6,5	6,5	6,0	6,5	6,5	6,0	-	38,0
SIA-10A	7,0	6,0	7,0	6,5	7,5	7,0	8,5	49,5
SIA-10B	7,0	6,5	7,5	5,5	6,0	6,5	6,0	45,0
SIA-11A	6,0	6,0	4,0	-	1,0	2,0	-	19,0
Σύνολο	75,5	70,0	59,0	59,9	47,5	58,3	38,0	408,2
Μέσος Όρος	6,8	6,3	5,2	5,4	4,8	5,5	4,2	36
Τυπική απόκλιση	1,4	1,4	1,4	1,9	2,5	2,0	2,7	10

Πίνακας Β.3: Τιμές pH αναρροφηθέντων δειγμάτων από το δωδεκαδάκτυλο για κάθε εθελοντή σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας.

	Χρόνος (min)							
Εθελοντής	5	10	20	30	40	50	60	Μέση Τιμή pH
SIA-1A	4,15	6,07	4,41	3,79	2,64	6,31	4,10	4,50
SIA-3A	6,12	2,17	6,15	6,76	6,46	6,35	7,18	5,88
SIA-4A	6,20	7,03	6,84	2,33	6,43	6,79	6,77	6,06
SIA-5A	6,19	6,33	6,41	7,55	Μ.Δ	7,43	7,37	6,88
SIA-6A	6,75	6,82	7,01	6,74	7,35	5,70	7,12	6,78
SIA-7A	5,92	6,23	5,74	6,34	Μ.Δ	Μ.Δ	Μ.Δ	6,06
SIA-8A	5,75	5,61	6,14	6,47	7,86	5,81	5,62	6,18
SIA-8B	5,90	5,72	5,09	5,43	6,50	6,18	7,28	6,01
SIA-9A	6,09	6,88	7,12	7,03	5,09	4,26	Μ.Δ	6,08
SIA-10A	6,85	8,18	7,16	6,67	6,38	5,25	6,42	6,70
SIA-10B	6,61	6,76	5,50	5,76	7,16	2,72	6,91	5,92
SIA-11A	5,70	6,13	4,32	Μ.Δ	7,55	7,33	Μ.Δ	6,21
Μέση τιμή	6,02	6,2	6,0	5,9	6,2	5,7	6,5	
Τυπική απόκλιση	0,70	1,4	1,0	1,5	1,5	1,4	1,1	
Ελάχιστο	4,15	2,17	4,32	2,33	2,64	2,72	4,10	
Διάμεση τιμή	6,11	6,28	6,15	6,47	6,48	6,18	6,91	
Μέγιστο	6,85	8,18	7,16	7,55	7,86	7,43	7,37	

*Μ.Δ: Μη διαθέσιμη τιμή λόγω έλλειψης δείγματος.

B.5.4 Χειρισμός αναρροφηθέντων δειγμάτων.

Όλα τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως των 1000 ml και συνενώθηκαν υπό συνεχή ανάδευση με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Το ποτήρι ζέσεως ήταν καλυμμένο με μεμβράνη παραφίνης καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας, για να αποφευχθεί τυχόν απώλεια CO₂ προς το περιβάλλον. Στη συνέχεια, αφού μετρήθηκε το pH του συνενωμένου μίγματος (pH=6,89), διαμοιράστηκε σε γυάλινους περιέκτες περιεκτικότητας 20 ml, οι οποίοι φυλάσσονται σε θερμοκρασία -70 °C μέχρι τελικής χρήσης τους.

B.6 Σχεδιασμός και εφαρμογή της διάταξης μBioGIT – Σύγκριση με το BioGIT

B.6.1 Η διάταξη BioGIT (Biorelevant Gastrointestinal Transfer system)

Το BioGIT αποτελεί μία συνεχή ανοιχτή *in vitro* τριδιαμερισματική διάταξη προσομοίωσης της γαστρεντερικής μεταφοράς κατά τη διαπεπτική περίοδο (Kourentas et al., 2016a) (Σχήμα Α.6). Αναπτύχθηκε βασιζόμενο στο μοντέλο που προτάθηκε από τους Symillides et al. (2013). Η χρησιμότητά του έγκειται στην εκτίμηση της συγκέντρωσης και του ποσοστού στερεών σωματιδίων *per os* χορηγούμενων φαρμακευτικών προϊόντων στο άνω τμήμα του λεπτού εντέρου κατά την διαπεπτική περίοδο.

Απαρτίζεται από τρία διαμερίσματα που αντίστοιχα προσομοιώνουν: το γαστρικό, το δωδεκαδακτυλικό και ένα διαμέρισμα-δεξαμενή (reservoir), το οποίο βοηθάει στη διατήρηση σταθερού όγκου και σύστασης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Το γαστρικό διαμέρισμα αποτελείται από ποτήρι διάλυσης χωρητικότητας 500 ml και πτερύγιο της εταιρείας Erweka (Hausenstamm, Germany). Για το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, χρησιμοποιείται ποτήρι διάλυσης χωρητικότητας 100 ml και το αντίστοιχο πτερύγιο της εταιρείας Distek (New Brunswick NJ, USA). Όλη η διάταξη του BioGIT, βρίσκεται μέσα σε σύστημα διάλυσης της Erweka (DT600 Erweka dissolution apparatus), για διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας κατά την

διάρκεια του πειράματος. Για την ενσωμάτωση του ποτηριού διάλυσης και του πτερυγίου του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος στο σύστημα διάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν αυτοσχέδιοι αντάπτορες. Οι όγκοι περιεχομένων γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος ορίζονται στα 250 ml και 40 ml αντίστοιχα.

Η μεταφορά των υγρών μέσω των διαμερισμάτων γίνεται με καταλλήλου διαμέτρου μεταλλικούς αγωγούς και πλαστικούς σωλήνες. Ο μεταλλικός αγωγός που χρησιμεύει στη μεταφορά περιεχομένων από το γαστρικό προς το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, είναι εσωτερικής διαμέτρου 0,3 cm και βρίσκεται σε απόσταση 1,7 cm από τον πυθμένα του ποτηριού διάλυσης. Οι αγωγοί που βρίσκονται στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, είναι όλοι ίδιας εσωτερικής διαμέτρου, ίσης με 0,1 cm. Οι αγωγοί που φέρουν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τα περιεχόμενα από το στόμαχο και το reservoir, τοποθετούνται σε απόσταση 1,5 cm από τον πυθμένα του ποτηριού διάλυσης, ενώ ο αγωγός εξόδου σε απόσταση 2,5 cm. Έτσι, εξασφαλίζεται και επαρκής ανάμιξη των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος πριν την δειγματοληψία. Οι αγωγοί σταθεροποιούνται στις καθορισμένες θέσεις με τη βοήθεια κατάλληλων στηριγμάτων που τοποθετούνται στην επιφάνεια των δύο ποτηριών διάλυσης. Τα πτερύγια ανάμιξης βρίσκονται σε απόσταση 1,1 cm και 0,5 cm από τον πυθμένα των ποτηριών διάλυσης, για το γαστρικό και το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα αντίστοιχα (Kourentas et al., 2016a).

Η θερμοκρασία κατά την διάρκεια ενός πειράματος διατηρείται σταθερή στους $37,0 \pm 0,5$ °C και η ταχύτητα περιστροφής των πτερυγίων ρυθμίζεται στις 75 rpm.

Η μεταφορά των περιεχομένων γίνεται με τη βοήθεια τρι-διαυλικής περισταλτικής αντλίας και κατάλληλων πλαστικών σωλήνων. Η αντλία συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο μπορεί να δημιουργηθεί κατάλληλο πρόγραμμα που να μεταβάλλει αυτόματα τις ροές σε κάθε διάυλο στους επιθυμητούς χρόνους.

Οι ροές μεταφοράς των περιεχομένων από το γαστρικό στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, F_1 , και από το διαμέρισμα-δεξαμενή προς το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, F_2 , (Σχήμα A.6) αλλάζουν ανά 10 λεπτά. Η ροή μεταφοράς των περιεχομένων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα προς την έξοδο, F , έχει σταθερή τιμή η οποία ισούται με το άθροισμα των εισερχόμενων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ροών (Πίνακας B.4). Η δειγματοληψία πραγματοποιείται από την έξοδο

στο μέσο κάθε δεκάλεπτου χρονικού διαστήματος και διαρκεί 40 δευτερόλεπτα (Πίνακας Β.5). Ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος κυμαίνεται περίπου στα 7,7 ml.

Πίνακας Β.4: Τιμές ροής των περιεχομένων μεταξύ των διαμερισμάτων της διάταξης BioGIT.

Χρονικό Διάστημα (min)	F ₁ (ml/min)	F ₂ (ml/min)	F (ml/min)
0-10	9,3	2,3	11,6
10-20	5,9	5,7	
20-30	3,7	7,9	
30-40	2,3	9,3	
40-50	1,4	10,2	
50-60	0,9	10,7	

Πίνακας Β.5: Χρόνοι δειγματοληψίας και αλλαγής περιεχομένου διαμερίσματος-δεξαμενής σε πείραμα με τη διάταξη BioGIT.

Χρονικό Διάστημα (min)	Δειγματοληψία	Αλλαγή περιεχομένου διαμερίσματος-δεξαμενής
0-10	4'40'' - 5'20''	10'
10-20	14'40'' - 15'20''	20'
20-30	24'40'' - 25'20''	30'
30-40	34'40'' - 35'20''	40'
40-50	44'40'' - 45'20''	50'
50-60	54'40'' - 55'20''	-

B.6.2 Η διάταξη μBioGIT

Για την χρήση της διάταξης BioGIT με μικρότερους όγκους υγρών μέσω προσωμοίωσης τόσο στο γαστρικό όσο και στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα καθώς και όταν έχουμε περιορισμένη ποσότητα δραστικής ουσίας, αναπτύχθηκε το σύστημα μBioGIT. Η διάταξη αυτή αποτελεί στην ουσία την εφαρμογή του BioGIT (Kourentas et al., 2016a) αλλά σε μικρή κλίμακα. Συγκεκριμένα, θεωρείται ότι ισχύει το ίδιο μοντέλο μεταφοράς του φαρμάκου μεταξύ των διαμερισμάτων (Σχήμα Α.6), (Εξ. Β.1)

$$\frac{A_I}{V_I} = Dose \frac{1}{V_I} \frac{k_G}{k_G - F/V_I} (e^{-(F/V_I)t} - e^{-k_G t}) \quad (\text{Εξ. Β.1})$$

Όπου, A_1 : η ποσότητα του φαρμάκου στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα

t : ο χρόνος από την έναρξη του πειράματος

V_1 : ο όγκος των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος

k_G : η πρωτοταξική σταθερά του ρυθμού γαστρικής κένωσης και

F : η ροή εξόδου του φαρμάκου από το σύστημα

Για την επίτευξη της ίδιας κινητικής μεταφοράς του φαρμάκου, χρησιμοποιούνται ίδιες τιμές, όπως και στο BioGIT, τόσο για την πρωτοταξική σταθερά του ρυθμού γαστρικής κένωσης (k_G) όσο και για την πρωτοταξική σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης (k_1) του φαρμάκου από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα. Έτσι, η γαστρική κένωση θεωρείται ότι γίνεται με χρόνο ημιζωής ($t_{1/2G}$) ίσο με 15 min. Η κύρια παράμετρος που είναι επιθυμητό να μειωθεί είναι ο όγκος των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος (V_1). Κατά συνέπεια, ο όγκος V_1 μειώνεται στο μισό, καθώς επίσης και η ροή εξόδου του φαρμάκου από το σύστημα, F , έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ίδια τιμή της k_1 ($k_1 = F / V_1$), όπως και στο BioGIT. Κατά την εφαρμογή του μBioGIT στην πράξη, παρομοίως μειώνονται στο μισό των αρχικών και οι ροές μεταφοράς F_1 και F_2 (Σχήμα Α.6), καθώς επίσης η δόση του φαρμάκου και ο όγκος των περιεχομένων του γαστρικού διαμερίσματος.

Ο εξοπλισμός και οι συσκευές που χρησιμοποιούνται είναι οι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιούνται στη διάταξη του BioGIT (Kourentas et al., 2016a). Ο όγκος των περιεχομένων του γαστρικού διαμερίσματος ορίζεται στα 125 ml (αντί των αρχικών 250 ml) και του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος στα 20 ml (αντί των αρχικών 40 ml). Οι νέες ροές μεταξύ των διαμερισμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα Β.6

Πίνακας Β.6: Τιμές ροής μεταξύ των διαμερισμάτων της διάταξης μBioGIT.

Χρονικό Διάστημα (min)	F_1 (ml/min)	F_2 (ml/min)	F (ml/min)
0-10	4,63	1,17	5,8
10-20	2,91	2,89	
20-30	1,84	3,96	
30-40	1,16	4,64	
40-50	0,73	5,07	
50-60	0,45	5,35	

Η δειγματοληψία πραγματοποιείται πάλι στο μέσο κάθε δεκάλεπτου χρονικού διαστήματος από την ροή εξόδου, όμως διαρκεί για 60 δευτερόλεπτα (αντί για 40), για να έχουμε επαρκή όγκο δείγματος για τους απαιτούμενους χειρισμούς ($\approx 5,8$ ml).

Ο χρησιμοποιούμενος όγκος στο γαστρικό διαμέρισμα και για τα πειράματα με τη διάταξη μBioGIT διατηρήθηκε τελικά στα 250 ml. Προκαταρκτικά πειράματα για απόδειξη ισοδυναμίας μεταξύ χρήσης στο γαστρικό διαμέρισμα 250 ml μέσου προσομοίωσης με τη “κανονική” δόση φαρμάκου έναντι 125 ml μέσου με τη μισή δόση φαρμάκου παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα Π.5. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν για αποφυγή πιθανού σφάλματος κατά την μείωση στο ήμισυ της χρησιμοποιούμενης στο γαστρικό διαμέρισμα δόσης (κυρίως σε περιπτώσεις φαρμάκων σε μορφή δισκίων ή καψακίων).

Η σύγκριση των προφίλ συνολικής ποσότητας ανά όγκο - χρόνου και συγκέντρωσης - χρόνου των δύο διατάξεων έγινε με τη βοήθεια δεικτών άμεσης σύγκρισης καμπυλών $f_{1,area}$, f_2 και ξ_i (Resigno A., 1992; Moore & Flanner, 1996; Vertzoni et al., 2003) έχοντας ως προφίλ αναφοράς αυτό των 125 ml. Συγκεκριμένα, ο δείκτης f_2 υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας πειραματικά σημεία ενώ οι δείκτες $f_{1,area}$ και ξ_i χρησιμοποιώντας μερικές επιφάνειες που ορίζονται από τα πειραματικά σημεία. Το όριο για ομοιότητα των προφίλ διάλυσης θεωρήθηκε: $> 50,0$ για τον δείκτη f_2 , $< 0,150$ για τον δείκτη $f_{1,area}$ και $< 0,111$ για τους δείκτες ξ_1 και ξ_2 .

Όλοι οι δείκτες έδειξαν ότι τα προφίλ των 250 ml με την κανονική δόση και των 125 ml με την μισή δόση ήταν όμοια, τόσο για την συνολική ($f_2 = 51,2$, $f_{1,area} = 0,072$, $\xi_1 = 0,037$, $\xi_2 = 0,059$) όσο και για την διαλυμένη ($f_2 = 53,7$, $f_{1,area} = 0,086$, $\xi_1 = 0,045$, $\xi_2 = 0,056$) ποσότητα πιογλιταζόνης ανά όγκο στο γαστρικό διαμέρισμα.

Η επεξεργασία των δεδομένων και οι στατιστικές δοκιμασίες έγιναν με το λογισμικό Sigma-Plot for Windows, version 11.0, Copyright© 2008 Systat Software, Inc., San Jose, California, U.S.A.

Για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα του συστήματος μBioGIT και η ισοδυναμία του με το BioGIT, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων με τρεις δραστικές ουσίες και στις δύο διατάξεις. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν στο γαστρικό διαμέρισμα: Διάλυμα ρανιτιδίνης (δόσης 300 mg), διάλυμα κετοκοναζόλης

(δόσης 300 mg) και δισκία πιогλιταζόνης (δόσης 15 mg). Τα αποτελέσματα από τις δύο διατάξεις συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

B.6.3 Σύσταση διαμερισμάτων

Στο γαστρικό και το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα προσομοίωσης της σύστασης των περιεχομένων του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου κατά την διαπεπτική περίοδο, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκαν 250 ml FaSSGF (Fasted State Simulated Gastric Fluid) επιπέδου προσομοίωσης III (Vertzoni et al., 2005), ενώ στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα 40 ml FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid) επιπέδου προσομοίωσης II (Galia et al., 1998) (Πίνακες B.7 και B.8). Στη διάταξη μBioGIT χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια μέσα αλλά σε όγκους 250 ml και 20 ml, στο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα αντίστοιχα. Τα επίπεδα προσομοίωσης βασίστηκαν στο σύστημα κατάταξης που προτάθηκε από τους Markopoulos et al. (2015).

Τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών που τοποθετήθηκαν στο διαμέρισμα-δεξαμενή, άλλαζαν κάθε 10 λεπτά και είχαν ως στόχο να διατηρούν σταθερή σύσταση στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα. Η σύστασή τους εξαρτάται από τα διαλύματα που βρίσκονται στο γαστρικό και το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα και τις χρησιμοποιούμενες ροές μεταξύ των διαμερισμάτων (Πίνακας B.9).

- ***Διαδικασία παρασκευής 1L FaSSGF επιπέδου προσομοίωσης III***

Σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 1000 ml, προστίθεται ποσότητα χλωριούχου νατρίου (NaCl) ίση με 1,9986 g, $\approx$ 1,5 ml πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 34 % w/w και 800 ml απιονισμένο H₂O. Μετά από καλή ανακίνηση, η ογκομετρική φιάλη τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού. Στη συνέχεια, προστίθενται άλλα 150 ml απιονισμένο H₂O, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως του 1000 ml και τοποθετείται σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης. Ρυθμίζεται το pH = 1,6 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αραιωμένου διαλύματος HCl 34 % w/w. Το περιεχόμενο μεταφέρεται ξανά στην ογκομετρική φιάλη και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή (διάλυμα A). Περίπου 500 ml του διαλύματος A μεταφέρονται σε γυάλινο περιέκτη και χρησιμοποιούνται για τη διάλυση 0,06 g SIF powder original υπό συνεχή ήπια μαγνητική ανάδευση. Όταν η

σκόνη διαλυθεί πλήρως, προστίθεται και η υπόλοιπη ποσότητα διαλύματος Α και το μέσο αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 2 ώρες (Διάλυμα Β). Τέλος, προστίθενται 0,5464 g πεψίνης στο διάλυμα Β, και διαλύονται με τη βοήθεια συσκευής μαγνητικής ανάδευσης. Όταν η σκόνη διαλυθεί πλήρως, το διάλυμα είναι έτοιμο προς χρήση.

- **Διαδικασία παρασκευής 1L FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II.**

Σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 1000 ml, προστίθεται ποσότητα 6,1946 g χλωριούχου νατρίου (NaCl) και 4,4712 g δισόξινου φωσφορικού νατρίου ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Προστίθενται ≈ 800 ml απιονισμένο H_2O και, μετά από καλή ανακίνηση, η ογκομετρική φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης των στερεών. Στη συνέχεια, προστίθενται άλλα 100 ml απιονισμένου νερού και το διάλυμα, αφού μεταφερθεί σε ποτήρι ζέσεως 1000 ml, τοποθετείται σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης. Ρυθμίζεται το pH = 6,5 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος NaOH 1M. Το περιεχόμενο μεταφέρεται ξανά στην ογκομετρική φιάλη και αραιώνεται με νερό μέχρι την χαραγή (διάλυμα Α). Περίπου 500 ml του διαλύματος Α μεταφέρονται σε γυάλινο περιέκτη και χρησιμοποιούνται για τη διάλυση 2,24 g SIF powder original υπό συνεχή ήπια μαγνητική ανάδευση. Όταν η σκόνη διαλυθεί πλήρως, προστίθεται και η υπόλοιπη ποσότητα διαλύματος Α και το μέσο αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 2 ώρες (Διάλυμα Β). Το διάλυμα είναι έτοιμο προς χρήση.

Πίνακας Β.7: Σύσταση υγρών μέσων προσομοίωσης γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος πειραμάτων με τις διατάξεις BioGIT και μBioGIT.

Συστατικά	FaSSGF (επιπέδου προσομοίωσης III)	FaSSIF (επιπέδου προσομοίωσης II)
Χλωριούχο νάτριο (mM)	34,2	106
Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (mM)	-	28,66
Ταυροχολικό νάτριο (mM)*	0,08	3,00
Φωσφατιδυλοχολίνη (mM)*	0,02	0,75
Πεψίνη (mg/ml)	0,1	-
Υδροχλωρικό οξύ	qs pH 1,6	-

*Η ενσωμάτωση τους στο διάλυμα έγινε με τη χρήση των προϊόντων SIF powder original της εταιρείας biorelevant.com, που τα περιέχουν σε αναλογία 1:4 (φωσφατιδυλοχολίνη : ταυροχολικό νάτριο).

Πίνακας Β.8: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών μέσων προσομοίωσης γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος πειραμάτων με τις διατάξεις BioGIT και μBioGIT.

Χαρακτηριστικά	FaSSGF (επιπέδου προσομοίωσης III)	FaSSIF (επιπέδου προσομοίωσης II)
pH	1,6	6,5
Ρυθμιστική χωρητικότητα (HCl) [(mmol/L)/ΔpH]	-	12
Ωσμωτικότητα (mOsmol/kg)	120	270

Πίνακας Β.9: Σύσταση και pH υγρών μέσων που τοποθετήθηκαν στο διαμέρισμα-δεξαμενή σε κάθε χρονικό διάστημα κατά τα πειράματα με τις διατάξεις BioGIT και μBioGIT.

Χρονικό Διάστημα (min)	pH	Χλωριούχο νάτριο (mM)	Λισόξινο φωσφορικό νάτριο (mM)	Ταυροχολικό νάτριο (mM)*	Φωσφατιδυλοχολίνη (mM)*
0-10	7,2	184	257,94	15,13	3,78
10-20	7,2	129	85,98	6,11	1,53
20-30	7,2	139	37,26	4,41	1,10
30-40	7,2	137	22,93	3,74	0,94
40-50	6,8	117	34,39	3,41	0,85
50-60	6,7	120	28,66	3,25	0,81

* Η ενσωμάτωση τους στο διάλυμα έγινε με τη χρήση των προϊόντων SIF powder original.

B.6.4 Φαρμακευτικά προϊόντα στο γαστρικό διαμέρισμα

Για την παρασκευή του διαλύματος ρανιτιδίνης (δόσης 300 mg) ακολουθείται η εξής διαδικασία: ζυγίζεται ποσότητα RNT ίση με 2,4 g, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 2000 ml και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι περίπου τα 2/3 της φιάλης. Εν συνεχεία, η ογκομετρική φιάλη τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων για λίγα λεπτά μέχρι πλήρους διάλυσης. Τέλος, προστίθεται νερό μέχρι την χαραγή.

Για την παρασκευή διαλύματος κετοκοναζόλης (δόσης 300 mg) ακολουθείται η εξής διαδικασία: σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml, προστίθενται 1,2 g

κετοκοναζόλη, ≈ 300 ml πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 37% w/w και λίγη ποσότητα (≈ 300 ml) επιτραπέζιου νερού Κρήτης[®]. Η ογκομετρική φιάλη τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης της ουσίας. Εάν η ουσία δεν διαλύεται, προστίθεται ακόμη λίγη ποσότητα νερού ή στάγδην μικρή ποσότητα διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (αν το $\text{pH} \geq 5$). Όταν η ουσία διαλυθεί πλήρως, προστίθεται νερό Κρήτης[®] μέχρι τελικού όγκου ≈ 900 ml και το διάλυμα μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως των 1000 ml. Υπό συνεχή έλεγχο του pH, προστίθεται στάγδην ποσότητα αραιωμένου διαλύματος HCl 34% w/w (1:1 με νερό), μέχρι τελικής τιμής $\text{pH} = 1,6$. Προστίθεται επιπλέον ποσότητα νερού, ώστε ο όγκος να είναι ≈ 990 ml. Τέλος, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με νερό. Μετά από καλή ανακίνηση, το διάλυμα είναι έτοιμο προς χρήση.

Για τα πειράματα με πιογλιταζόνη, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα δισκία πιογλιταζόνης (δόσης 15 mg). Συγκεκριμένα, ένα δισκίο πιογλιταζόνης προστίθεται σε 250 ml διαλύματος FaSSGF επιπέδου προσομοίωσης III στο γαστρικό διαμέρισμα.

Για τα πειράματα με τις δραστικές ουσίες A και B με την διάταξη BioGIT ζυγίστηκε η επιθυμητή ποσότητα φαρμακοτεχνικής μορφής και μεταφέρθηκε σε 250 ml FaSSGF επιπέδου προσομοίωσης III. Για την δραστική ουσία A εξετάστηκαν οι δόσεις των 12 και 150 mg, ενώ για την δραστική ουσία B οι δόσεις των 10 και 50 mg.

B.6.5 Εκτέλεση πειραματικής διαδικασίας

Όταν στο γαστρικό διαμέρισμα έχουμε δισκίο ή σκόνη, η ανάδευση είναι απαραίτητη, εν αντιθέσει με την περίπτωση διαλύματος ουσίας όπου η τοποθέτηση περιστρεφόμενου πτερυγίου στο γαστρικό διαμέρισμα μπορεί να παραληφθεί. Έτσι, στην περίπτωση διαλυμάτων ουσιών, ο δειγματολήπτης μπορεί να τοποθετηθεί πιο κοντά στον πυθμένα του ποτηριού διάλυσης επιτρέποντας δειγματοληψία μέχρι και τα 55 min. Στην περίπτωση στερεών μορφών στο γαστρικό διαμέρισμα, ο δειγματολήπτης τοποθετείται στην ελάχιστη απόσταση των 1,7 cm από τον πυθμένα του ποτηριού διάλυσης (ώστε να μην εμποδίζεται η περιστροφή του πτερυγίου) και ο μέγιστος χρόνος δειγματοληψίας ορίζεται στα 45 min. Στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα η χρήση περιστρεφόμενου πτερυγίου κρίνεται πάντα απαραίτητη, για

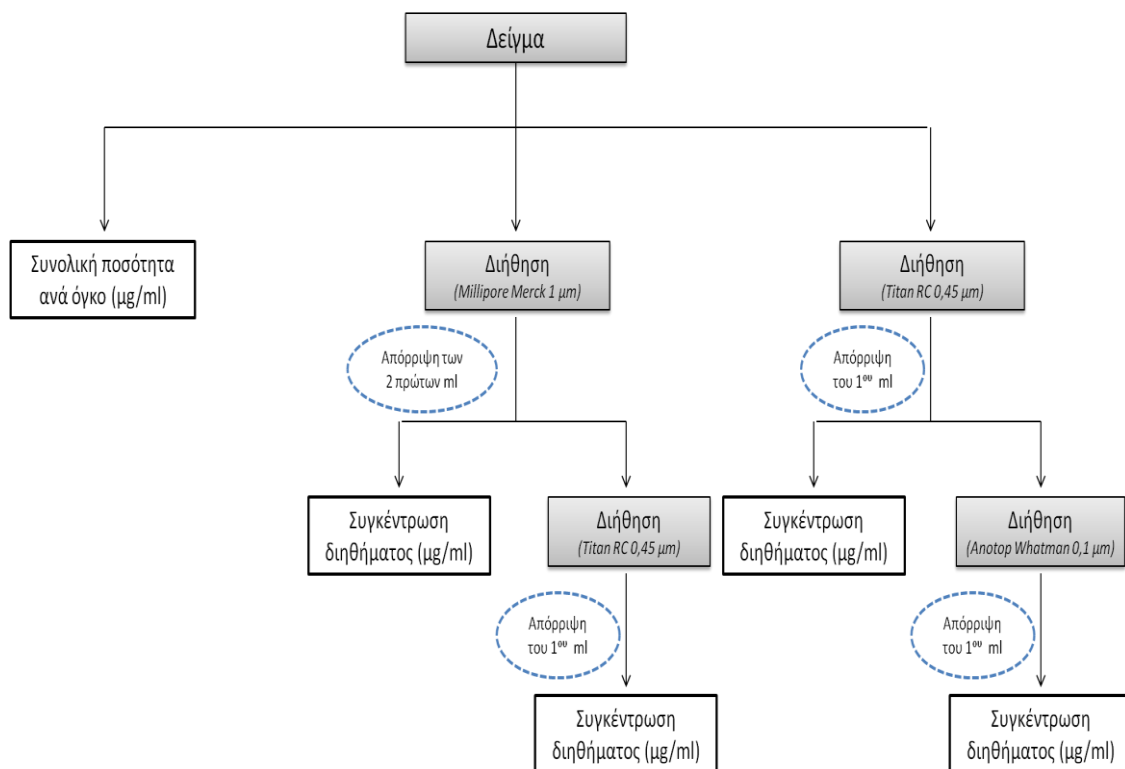
επίτευξη ομοιόμορφης ανάδευσης των περιεχομένων του με αυτά που έρχονται από το γαστρικό διαμέρισμα και το διαμέρισμα-δεξαμενή.

Στην διάταξη BioGIT η δειγματοληψία πραγματοποιείται από την ροή εξόδου και διαρκεί 40 δευτερόλεπτα, ενώ στην διάταξη μBioGIT ορίζεται στα 60 δευτερόλεπτα, ώστε να συλλεχθεί όγκος δείγματος επαρκής για τους απαιτούμενους χειρισμούς (7,7 ml και 5,8 ml αντίστοιχα).

Κάθε δείγμα χωρίζεται σε δύο μέρη. Το πρώτο μέρος χρησιμοποιείται για προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας ουσίας ανά όγκο στο δείγμα (στερεό και διαλυμένο), C_t , μετά από άμεση προσθήκη κατάλληλου όγκου κινητής φάσης. Το δεύτερο, αφού διηθηθεί αμέσως από κατάλληλου τύπου ηθμό, χρησιμοποιείται για προσδιορισμό της διαλυμένης μόνο ποσότητας ουσίας ανά όγκο στο δείγμα, C , μετά από αραίωση με κατάλληλο όγκο κινητής φάσης.

Για την δραστική ουσία B, ακολουθήθηκε διαφορετική διαδικασία, γιατί πραγματοποιήθηκε παράλληλα και έλεγχος της κατανομής μεγέθους στερεών σωματιδίων στα δείγματα. Το δείγμα μετά την συλλογή του χωρίζονταν σε τρία τμήματα. Το πρώτο χρησιμοποιείτο για μέτρηση της ολικής ποσότητας ουσίας ανά όγκο στο δείγμα (διαλυμένο και στερεό), C_t . Το δεύτερο διηθούνταν αρχικά από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm και το διήθημα διηθούνταν από ηθμούς μεγέθους πόρων 0,45 μm , για προσδιορισμό ποσοστού σωματιδίων με μέγεθος $> 1 \mu\text{m}$ και μεταξύ 1 και 0,45 μm . Τέλος, το τρίτο τμήμα διηθούνταν αρχικά από ηθμούς μεγέθους πόρων 0,45 μm και το διήθημα από ηθμούς 0,1 μm , για προσδιορισμό ποσοστού σωματιδίων με μέγεθος μεταξύ 0,45 μm και 0,1 μm και σωματιδίων $< 0,1 \mu\text{m}$. Στο σχήμα B.1 παρουσιάζεται διαγραμματικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε.

Για τις ουσίες πιογλιταζόνη, δραστική ουσία A και δραστική ουσία B έγινε και προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού τους, C_s , σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα, 3 ml διηθήματος μεταφέρθηκαν σε γυάλινους περιέκτες με περίσσεια δραστικής ουσίας και επώαστηκαν για 16-24 ώρες σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (75 rpm, 37 °C).



Σχήμα B.1: Διαγραμματική απεικόνιση διαδικασίας χειρισμού δειγμάτων που λαμβάνεται από την διάταξη BioGIT για την δραστική ουσία B, με σκοπό την μελέτη κατανομής μεγέθους σωματιδίων σε κάθε δείγμα.

B.7 *In vitro* μεθοδολογία για τη μελέτη της συμπεριφοράς λιπόφιλων φαρμάκων σε περιβάλλον μέσου προσομοίωσης δωδεκαδακτύλου (FaSSiF) και αναρροφηθέντων εντερικών υγρών (HIF_{fasted}) (“20-30 min one-step”).

Ο σχεδιασμός του BioGIT (και κατ’ επέκταση του μBioGIT) βασίστηκε σε μοντελοποίηση ενδοαυλικών δεδομένων από κλινική μελέτη (Kourentas et al., 2016a). Με βάση το μοντέλο της γαστρεντερικής διάβασης, η μεταφορά και η ανανέωση των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος γίνεται με συνεχή διαδικασία. Όταν μελετάται η συμπεριφορά φαρμάκων σε μέσο που προσομοιώνει τα περιεχόμενα του δωδεκαδάκτυλου (π.χ. σε FaSSiF), όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, παρά τη συνεχή μεταφορά, η σύσταση των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος διατηρείται σταθερή με την προσθήκη κατάλληλων διαλυμάτων από το διαμέρισμα-δεξαμενή. Στην περίπτωση όμως που

επιθυμείται η μελέτη της συμπεριφοράς φαρμάκων σε αναρροφηθέντα εντερικά υγρά, τότε ένα σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η αναπλήρωση του όγκου και της σύστασης των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος. Είναι προφανές ότι, οι διαθέσιμοι όγκοι αναρροφηθέντων εντερικών υγρών είναι συνήθως εξαιρετικά περιορισμένοι και κατά συνέπεια είναι πρακτικά αδύνατο να χρησιμοποιηθούν στο διαμέρισμα-δεξαμενή για αναπλήρωση των υγρών που εξέρχονται από το σύστημα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διαρκή και σημαντική “αραίωση” των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος (δηλαδή των αναρροφηθέντων εντερικών υγρών που αρχικά τοποθετούνται στο διαμέρισμα) με τα διαλύματα από το διαμέρισμα-δεξαμενή.

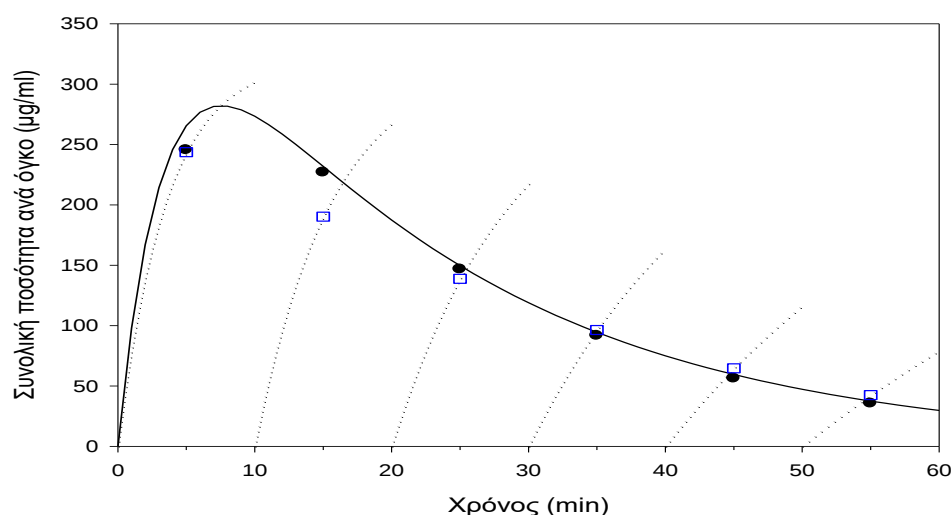
Για την αντιμετώπιση του πιο πάνω προβλήματος, χρησιμοποιήθηκε μια μεθοδολογία που δε βασίζεται στη συνεχή γαστρεντερική διάβαση των περιεχομένων, αλλά θεωρεί ότι γίνεται πλήρης ανανέωση των εντερικών υγρών ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με αποτέλεσμα η διάβαση να γίνεται “κατά βήματα” (step-wise) (Psahoulas et al., 2012). Αν και η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιεί για διάφορα χρονικά διαστήματα (“παράθυρα” χρόνου) διακριτά πειράματα για τη μελέτη της μεταφοράς από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, παρουσιάζει μικρότερη “αραίωση” των περιεχομένων.

Έτσι, για την μελέτη και σύγκριση της ενδοαυλικής συμπεριφοράς των εξεταζόμενων φαρμακευτικών προϊόντων τόσο σε μέσο προσομοίωσης εντερικού περιβάλλοντος (FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II) όσο και σε αναρροφηθέντα κατά τη διαπεπτική περίοδο εντερικά υγρά (HIF_{fasted}), χρησιμοποιήθηκε διάταξη που βασίστηκε σε αυτή που προτάθηκε το 2012 από τους Psachoulas et al. Στην νέα τροποποιημένη μεθοδολογία ο όγκος των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος μειώθηκε στα 20 ml (σε σύγκριση με τον αρχικό όγκο των 60 ml) έτσι ώστε να μειωθεί ο όγκος των HIF_{fasted} . Αντίστοιχα μεταβλήθηκαν και οι ρυθμοί ροής μεταξύ των διαμερισμάτων της διάταξης (F_1 , F_2 και F οι ρυθμοί ροής από γαστρικό προς δωδεκαδακτυλικό, από διαμέρισμα-δεξαμενή προς δωδεκαδακτυλικό και από δωδεκαδακτυλικό προς έξοδο, αντίστοιχα). Επίσης, για να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων από την διάταξη αυτή με αυτά από το σύστημα BioGIT, τα χρονικά διαστήματα κατά τα οποία οι ρυθμοί ροής παρέμεναν σταθεροί μεταβλήθηκαν από 15 σε 10 λεπτά. Αναλυτικά οι ρυθμοί ροής για το χρονικό διάστημα 0-30 λεπτά παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.10.

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο όγκος των περιεχομένων του γαστρικού διαμερίσματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 250 ml με “κανονική δόση” φαρμάκου για τους λόγους που αναφέρθηκαν στο πεδίο B.6.2.

Λόγω του περιορισμένου όγκου των αναρροφηθέντων HIF_{fasted} η μελέτη της ενδοαυλικής συμπεριφοράς των φαρμάκων κρίθηκε σκόπιμο να περιοριστεί μόνο σε ένα χρονικό διάστημα παρατήρησης (“παράθυρο” χρόνου). Έτσι, η μελέτη έγινε για ένα βήμα (one-step) από τα διαδοχικά βήματα της διαδικασίας της διάβασης.

Το χρονικό “παράθυρο” που επιλέχθηκε για μελέτη στη νέα διάταξη είναι τα 20-30 λεπτά. Η απόφαση βασίστηκε στην μικρότερη παρατηρούμενη αραίωση στο χρονικό “παράθυρο” των 20-30 λεπτών (στα 25 λεπτά στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα θα έχουν παραμείνει 11,5 ml από τα αρχικά 20 ml HIF_{fasted}). Επίσης, στο χρονικό αυτό διάστημα αναμένεται οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου να είναι ακόμα αρκετά υψηλές, με αποτέλεσμα ικανοποιητική ευαισθησία της μεθόδου. Τέλος, όπως φαίνεται και από το Σχήμα B.2 που δείχνει τις θεωρητικές και αναμενόμενες τιμές σε κάθε χρόνο και με τις δύο μεθοδολογίες, σε χρόνο δειγματοληψίας 25 λεπτά, οι αναμενόμενες τιμές με τις δύο διατάξεις είναι αρκετά κοντά.



Σχήμα B.2: Σχηματική απεικόνιση των θεωρητικά αναμενόμενων τιμών σε κάθε χρόνο, με την διάταξη του BioGIT και την νέα διάταξη “20-30 min one-step”. Οι μαύροι κύκλοι αναπαριστούν τις αναμενόμενες τιμές στο μέσο κάθε χρονικού παραθύρου με την συνεχή διάταξη BioGIT, ενώ τα λευκά τετράγωνα αναπαριστούν τις αναμενόμενες τιμές με τη νέα μη συνεχόμενη διάταξη “one-step”. Με συνεχή γραμμή απεικονίζονται οι θεωρητικές τιμές από το συνεχές μοντέλο μεταφοράς (θεωρώντας ομοιογενή κένωση του γαστρικού διαμερίσματος) και με διακεκομμένες γραμμές για το μη συνεχές μοντέλο “20-30 min one-step”.

Πίνακας B.10: Ρυθμοί ροής μεταξύ των διαμερισμάτων της νέας διάταξης για τη μελέτη ενδοαυλικής συμπεριφοράς φαρμακευτικών προϊόντων στη διάρκεια του χρονικού διαστήματος 20-30 λεπτών.

Χρονικό Διάστημα (min)	F ₁ (ml/min)	F ₂ (ml/min)	F (ml/min)
0-10	4,63	-	-
10-20	2,91	-	-
20-30	1,84	0,46	2,3

Για την προσομοίωση της διάλυσης στο στόμαχο με περισσότερο επαναλήψιμο τρόπο και την διευκόλυνση της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικά διαθέσιμες συσκευές και τα εξαρτήματα που παρουσιάζονται και κατά την περιγραφή της διάταξης BioGIT (Κεφάλαιο B.6).

B.7.1 Σύσταση διαμερισμάτων νέας διάταξης

Στο γαστρικό διαμέρισμα χρησιμοποιήθηκε FaSSGF επιπέδου προσομοίωσης III, ενώ στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα χρησιμοποιήθηκαν είτε μέσο προσομοίωσης FaSSIF (επιπέδου προσομοίωσης II) είτε ανθρώπινα αναρροφηθέντα δωδεκαδακτυλικά υγρά (HIF_{fasted}). Στο διαμέρισμα-δεξαμενή τοποθετήθηκε κατάλληλο διάλυμα συμπυκνωμένου FaSSIF, με ρυθμιστική χωρητικότητα 7 φορές μεγαλύτερου αυτής του FaSSIF. Στον Πίνακα B.11 παρουσιάζεται η σύσταση του διαλύματος του διαμερίσματος-δεξαμενή για το χρονικό διάστημα 20-30 λεπτά.

Πίνακας B.11: Σύσταση διαλύματος του διαμερίσματος-δεξαμενής για το χρονικό διάστημα 20-30 λεπτά.

Χρονικό Διάστημα (min)	pH	Χλωριούχο νάτριο (mM)	Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (mM)	Ταυροχολικό νάτριο (mM)*	Φωσφατιδυλοχολίνη (mM)*
20-30	7,3	284	200,64	15	3,75

* Η ενσωμάτωση τους στο διάλυμα έγινε με τη χρήση των προϊόντων SIF powder original.

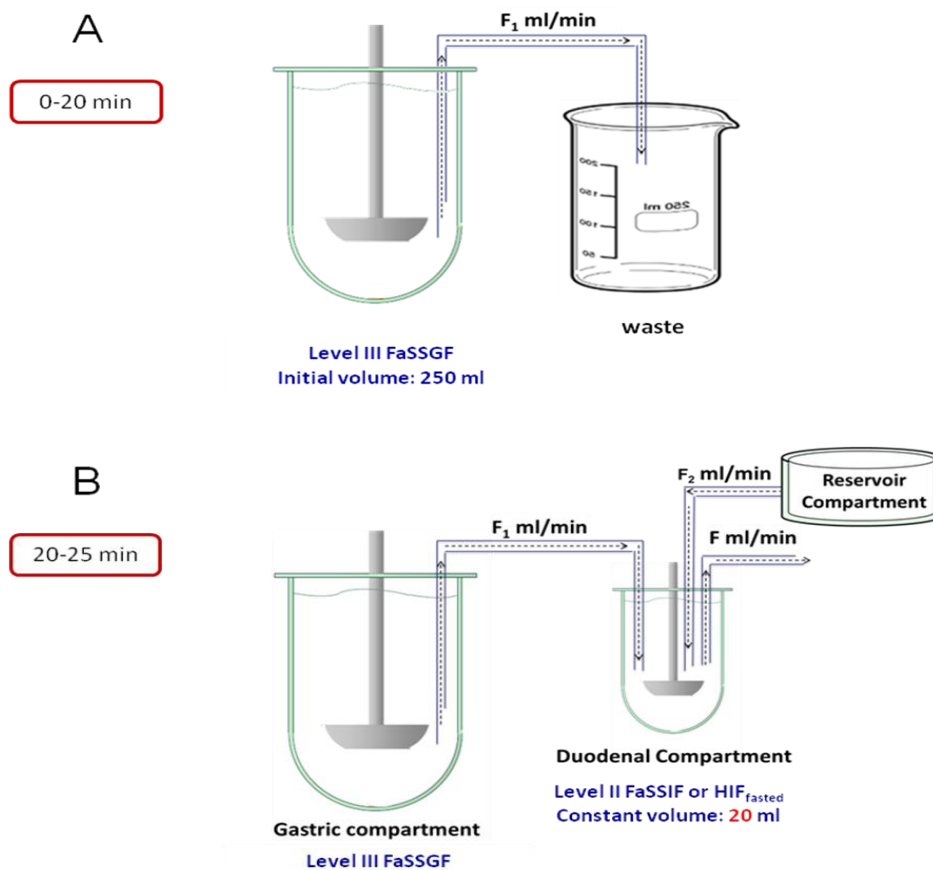
B.7.2 Εκτέλεση πειραματικής διαδικασίας

Αρχικά, τοποθετούνται στο γαστρικό διαμέρισμα 250 ml FaSSGF επιπέδου προσομοίωσης III, στο δωδεκαδακτυλικό 20 ml FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II και στο διαμέρισμα-δεξαμενή συμπυκνωμένο FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II. Γίνονται οι κατάλληλες συνδέσεις και προγραμματίζεται ο έλεγχος ροών μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή (Πίνακας B.10). Όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετείται μέσο προσομοίωσης, αυτό μεταφέρεται στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα από την αρχή του πειράματος. Για την εκτίμηση της παρουσίας της δραστικής ουσίας στη διάρκεια των 20-30 λεπτών, στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα εισέρχονται μόνο τα εξερχόμενα γαστρικά περιεχόμενα της περιόδου 20-25 min. Τα περιεχόμενα της περιόδου 0-20 min απορρίπτονται. Δείγμα λαμβάνεται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τη χρονική στιγμή 25 min.

Όταν πραγματοποιούνται πειράματα με HIF_{fasted} , αυτό δεν μεταφέρεται εξ' αρχής στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, αλλά περίπου στα 18 λεπτά από την έναρξη

του πειράματος, για να μην έχουμε απώλεια CO_2 . Ο γυάλινος περιέκτης με το $\text{HIF}_{\text{fasted}}$ αφήνεται να ξεπαγώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, μετράται το pH του και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα HCl 1M, για ρύθμιση του pH σε $\approx 6,45$. Ο περιέκτης κλείνεται καλά και ξεκινάει η πειραματική διαδικασία. Στα 18 λεπτά από την έναρξη του πειράματος το $\text{HIF}_{\text{fasted}}$ μεταφέρεται στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, ώστε να μπορέσει να αποκτήσει την επιθυμητή θερμοκρασία, και συνδέονται οι μεταλλικοί δειγματολήπτες των ροών F_2 και F . Στα 20 λεπτά συνδέεται και ο δειγματολήπτης της ροής F_1 . Έτσι, τα εξερχόμενα περιεχόμενα του γαστρικού διαμερίσματος της χρονικής περιόδου 0-20 min απορρίπτονται και μόνο αυτά της περιόδου 20-25 min εισέρχονται στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα. Δείγμα λαμβάνεται και πάλι από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα 25 λεπτά. Η νέα μη-συνεχής διάταξη “20-30 min one-step” παρουσιάζεται στο Σχήμα B.3.

Ο χειρισμός των δειγμάτων είναι ίδιος με αυτόν που έγινε για τα δείγματα που λαμβάνονταν από την διάταξη BioGIT και παρουσιάζεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο B.6.5.



Σχήμα B.3: Διαγραμματική απεικόνιση της νέας μη-συνεχούς διάταξης “20-30 min one-step”. Για χρονικό διάστημα 0-20 λεπτά τα εξερχόμενα περιεχόμενα του γαστρικού διαμερίσματος (F_1) απορρίπτονται (Σχήμα A), ενώ από 20-25 λεπτά εισέρχονται στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα (Σχήμα B).

B.8 Ανάλυση πειραματικών δεδομένων

Με βάση τις καμπύλες αναφοράς ποσοτικοποιήθηκαν τα δείγματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις διαλυτότητας και τα πειράματα από τις *in vitro* διατάξεις (Παράρτημα Π.1).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με τις διατάξεις BioGIT και μBioGIT έγινε με υπολογισμό της % μέσης σχετικής διαφοράς (% MRD, Mean Relative Difference) της ποσότητας του φαρμάκου ανά όγκο που μετρήθηκε στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα (Εξ. Β.2) σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας.

$$\%MRD = \frac{A_{\mu B} - A_B}{A_B} 100 \quad (\text{Εξ. Β.2})$$

Όπου,

$A_{\mu B}$: Μέση ποσότητα του φαρμάκου ανά όγκο που μετρήθηκε στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα του μBioGIT σε ένα χρόνο δειγματοληψίας (t_i).

A_B : Μέση ποσότητα του φαρμάκου ανά όγκο που μετρήθηκε στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα του BioGIT στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας (t_i).

Οι πιο πάνω υπολογισμοί έγιναν τόσο για τη μέση συνολική ποσότητα (διαλυμένη και αδιάλυτη) όσο και για τη μέση διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο που μετρήθηκε σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας.

Επίσης, η σύγκριση των προφίλ που ελήφθησαν με τις διατάξεις BioGIT και μBioGIT τόσο για τη μέση συνολική ποσότητα όσο και για τη μέση διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα έγινε και με δείκτες άμεσης σύγκρισης καμπυλών $f_{1,area}$, ξ_1 και ξ_2 (Resigno A., 1992; Moore & Flanner, 1996; Vertzoni et al., 2003), χρησιμοποιώντας μερικές επιφάνειες κάτω από την καμπύλη.

Η σύγκριση της συμπεριφοράς λιπόφιλων φαρμάκων σε περιβάλλον μέσου προσομοίωσης δωδεκαδακτύλου (FaSSIF) και αναρροφηθέντων εντερικών υγρών (HIF_{fasted}) με τη διάταξη “20-30 min one-step” έγινε με τη στατιστική δοκιμασία t (unpaired t -test) τόσο για τη μέση συνολική ποσότητα (διαλυμένη και αδιάλυτη) ανά όγκο όσο και για τη μέση διαλυμένη ποσότητα που μετρήθηκε ανά όγκο σε κάθε μέσο.

Επίσης, για κάθε φάρμακο και κάθε μέσο υπολογίστηκε το κλάσμα της στερεής (αδιάλυτης) ουσίας ανά όγκο (SF, Solid Fraction) ως ο λόγος

$$SF = \frac{A_T - A_D}{A_T} \quad (\text{Εξ. B.3})$$

Όπου,

A_T : Συνολική ποσότητα (διαλυμένη και αδιάλυτη) του φαρμάκου ανά όγκο μέσου.

A_D : Διαλυμένη ποσότητα του φαρμάκου ανά όγκο μέσου.

Στη συνέχεια, για όλα τα φάρμακα και όλες τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν, έγινε σύγκριση των τιμών SF που υπολογίστηκαν στα δύο μέσα, FaSSIF και HIF_{fasted}, με τη στατιστική δοκιμασία t (unpaired t-test).

Στις περιπτώσεις που τα δεδομένα δεν παρουσίαζαν κανονική κατανομή, η σύγκριση έγινε με τη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney.

Η επεξεργασία των δεδομένων και οι στατιστικές δοκιμασίες έγιναν με το λογισμικό Sigma-Plot for Windows, version 11.0, Copyright© 2008 Systat Software, Inc., San Jose, California, U.S.A.

Για την εύρεση της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στα δείγματα από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα για την δραστική ουσία B, λόγω της υψηλής και μη σταθερής προσρόφησης στους ηθμούς μεγέθους πόρων 1μm (Παράρτημα Π.7), ακολούθησε κανονικοποίηση των υπολογιζόμενων ποσοστών σωματιδίων τάξης μεγέθους > 1 μm και μεταξύ 1-0,45 μm.

Συγκεκριμένα, για την εύρεση του ποσοστού σωματιδίων μεταξύ δύο τιμών μεγέθους, μετά από δύο διαδοχικές διηθήσεις, χρησιμοποιούνταν η εξίσωση B.4.

$$\text{ποσοστό \%} = \frac{C_a - C_b}{C_t} \quad (\text{Εξ. B.4})$$

Όπου,

C_a : η συνολική ποσότητα της ουσίας στο διήθημα μετά από διήθηση μέσω του πρώτου ηθμού.

C_b : η συνολική ποσότητα της ουσίας στο διήθημα μετά από διήθηση μέσω του δεύτερου ηθμού.

C_t : το συνολικό περιεχόμενο της δραστικής ουσίας (αδιάλυτο και διαλυμένο) στο δείγμα, πριν από οποιαδήποτε διήθηση.

Για την εύρεση του ποσοστού σωματιδίων με μέγεθος $> 1\mu\text{m}$ και αυτών στην τάξη μεγέθους από 1 μέχρι $0,45\mu\text{m}$, λόγω προσρόφησης των ηθμών μεγέθους πόρων $1\mu\text{m}$, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εξίσωση B.4 δεν κρίθηκαν αξιόπιστα. Για το λόγο αυτό, κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το ποσοστό % σωματιδίων μεγέθους $> 0,45\mu\text{m}$, που προκύπτει από την εξίσωση B.4 βάζοντας όπου C_a την συνολική ποσότητα ουσίας στο δείγμα (C_t) και όπου C_b τη συγκέντρωση μετά από διήθηση εξ' αρχής από ηθμούς μεγέθους πόρων $0,45\mu\text{m}$. Η διαδικασία αυτή είναι δυνατή λόγω αμελητέας προσρόφησης επί των ηθμών $0,45\mu\text{m}$ (Παράρτημα Π.7).

Στα δεδομένα που συλλέχθηκαν με τη διάταξη “20-30 min one-step”, έγινε διπαραγοντική Ανάλυση Διασποράς (ANOVA) για έλεγχο πιθανής διαφοροποίησης της κατανομής των διαφόρων μεγεθών σωματιδίων στα δύο μέσα (FaSSIF vs HIF_{fasted}) και για τις δύο δόσεις της δραστικής ουσίας B (10 mg και 50 mg). Το επίπεδο σημαντικότητας ήταν 0,05.

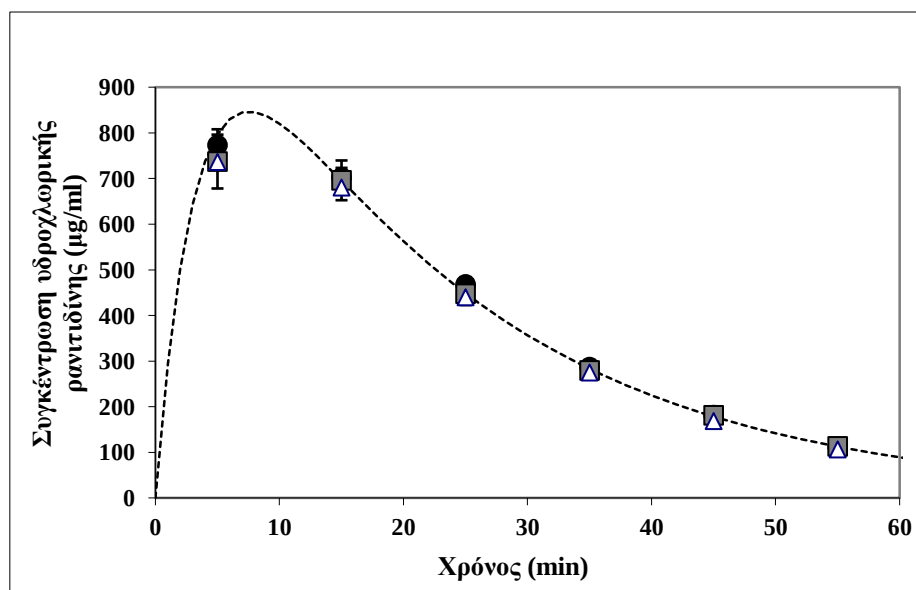
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ.1 Σύγκριση αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τις διατάξεις BioGIT και μBioGIT

Για την εξέταση της αποτελεσματικότητας και ισοδυναμίας της διάταξης μικρής κλίμακας μBioGIT σε σχέση με την αρχική διάταξη του BioGIT, πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με τρεις δραστικές ουσίες και στις δύο διατάξεις. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ρανιτιδίνης δόσης 300 mg, διάλυμα κετοκοναζόλης δόσης 300 mg και δισκία πιογλιταζόνης δόσης 15 mg. Αναλυτικά τα πρωτογενή δεδομένα των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Π.6.

Γ.1.1 Διάλυμα ρανιτιδίνης

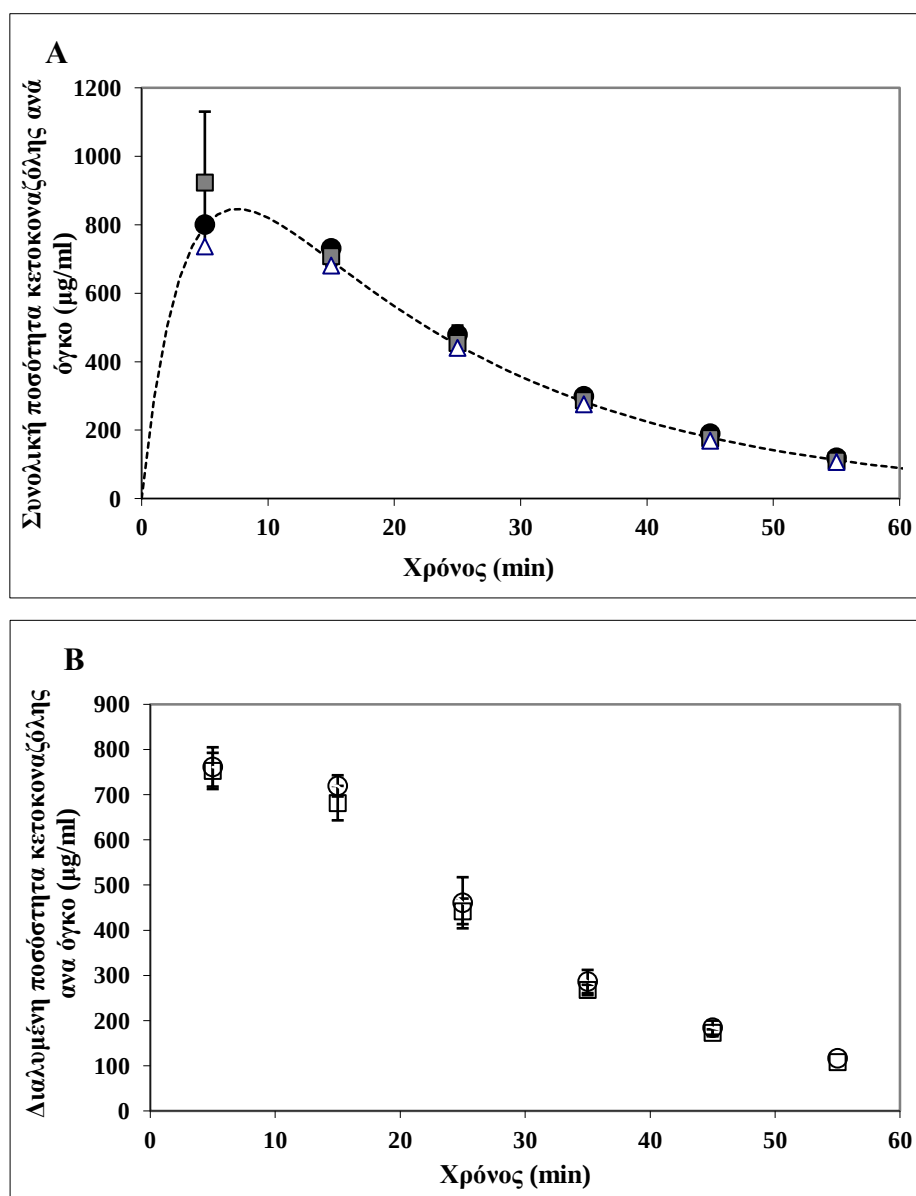
Η ρανιτιδίνη είναι ένα μόριο υψηλής διαλυτότητας στο νερό που δεν καθιζάνει στο περιβάλλον του δωδεκαδακτύλου και παραμένει πλήρως διαλυμένο. Όπως φαίνεται από το Σχήμα Γ.1, οι μετρούμενες συγκεντρώσεις σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας και με τις δύο διατάξεις είναι παρόμοιες με πολύ καλή επαναληψιμότητα. Επίσης, η % μέση σχετική απόκλιση (%MRD) για την κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας κυμάνθηκε, κατά απόλυτη τιμή, από 0,2 μέχρι 4,7 %. Τέλος, η ομοιότητα των δύο προφίλ επιβεβαιώνεται και βάσει δεικτών άμεσης σύγκρισης καμπυλών $f_{1,area}$, ξ_1 και ξ_2 , με τιμές $f_{1,area} = 0,027$, $\xi_1 = 0,014$ και $\xi_2 = 0,017$.



Σχήμα Γ.1: Συγκέντρωση ρανιτιδίνης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης στη διάταξη BioGIT [μαύροι κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και στην διάταξη μ BioGIT [γκρι τετράγωνα, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)]. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα προσομοιωμένα δεδομένα που προέκυψαν από το μοντέλο μεταφοράς [θεωρητικές τιμές για ομοιογενή μεταφορά, διακεκομμένη γραμμή] και από την προσέγγιση του μοντέλου μεταφοράς [αναμενόμενες τιμές, λευκά τρίγωνα].

Γ.1.2 Διάλυμα κετοконаζόλης

Η κετοконаζόλη χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα στο γαστρικό διαμέρισμα και μετρήθηκε η συνολική και η διαλυμένη ποσότητά της στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Η συνολική ποσότητα ανά όγκο περιλαμβάνει τόσο την διαλυμένη ποσότητα κετοконаζόλης όσο και την ποσότητα που καθιζάνει εισερχόμενη στο δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον. Η διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο προκύπτει με μέτρηση της συγκέντρωσης στο διήθημα μετά από διήθηση μέσω ηθμών μεγέθους πόρων 0,45 μm . Στο Σχήμα Γ.2 παρουσιάζονται οι συνολικές και διαλυμένες ποσότητες ανά όγκο για τις δύο διατάξεις.

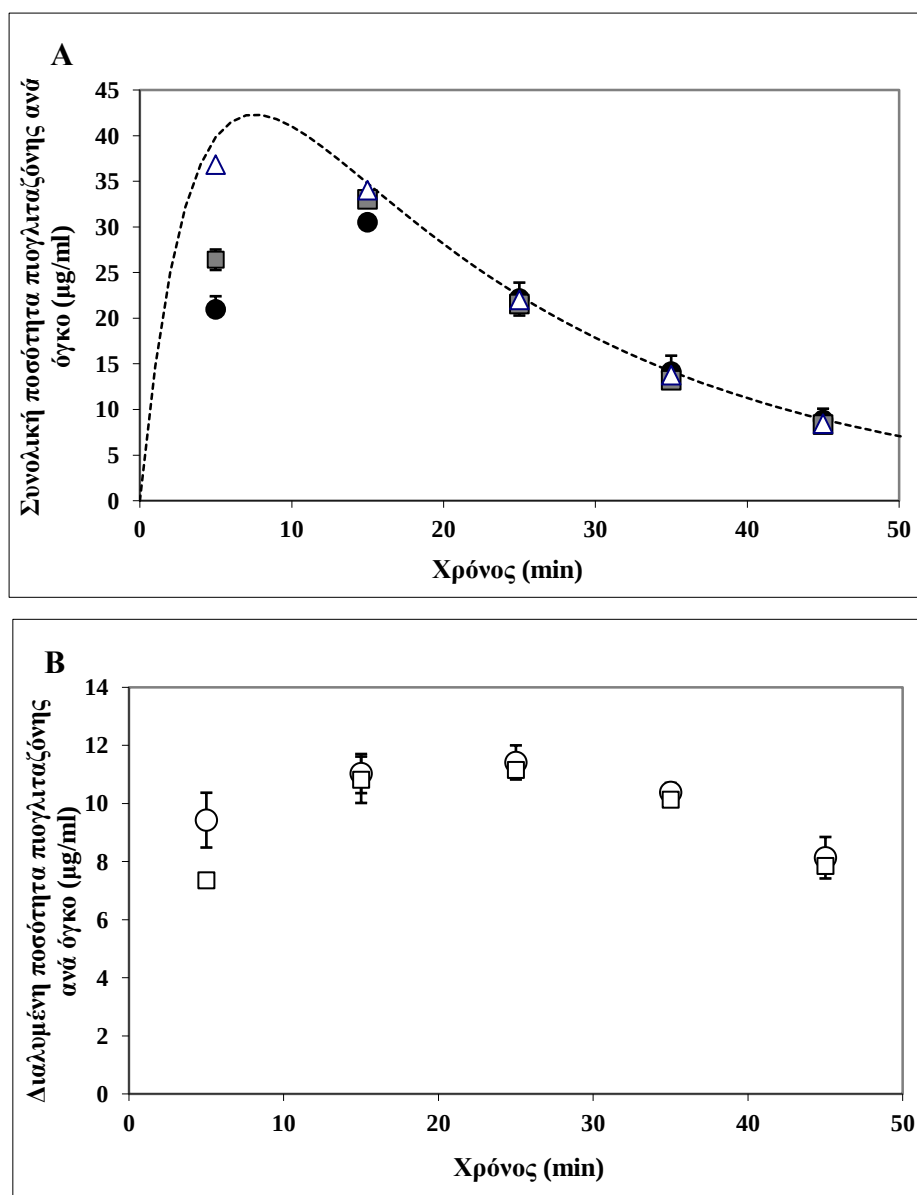


Σχήμα Γ.2: Συνολική ποσότητα κετοκοναζόλης ανά όγκο (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη ποσότητα) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης στη διάταξη BioGIT [μαύροι κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και στην διάταξη μ BioGIT [γκρι τετράγωνα, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)]. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα προσομοιωμένα δεδομένα που προέκυψαν από το μοντέλο μεταφοράς [θεωρητικές τιμές για ομοιογενή μεταφορά, διακεκομμένη γραμμή] και από την προσέγγιση του μοντέλου μεταφοράς [αναμενόμενες τιμές, λευκά τρίγωνα] (A). Διαλυμένη ποσότητα κετοκοναζόλης ανά όγκο στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στη διάταξη BioGIT [λευκοί κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και στην διάταξη μ BioGIT [λευκά τετράγωνα, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] (B).

Όπως φαίνεται και στα σχήματα, οι δύο διατάξεις δίνουν παρόμοιες συνολικές και διαλυμένες ποσότητες, με πολύ καλή επαναληψιμότητα (εκτός από την συνολική ποσότητα στα 5 λεπτά στην διάταξη μBioGIT που έχει σχετική τυπική απόκλιση 22,47% που οφείλεται κυρίως σε μία μέτρηση). Για την συνολική ποσότητα, η %MRD κυμάνθηκε, κατά απόλυτη τιμή, από 3,1 μέχρι 7,3% για τα 15 - 55 λεπτά, ενώ στα 5 λεπτά παρατηρήθηκε απόκλιση 15,33 %. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις, η %MRD κυμάνθηκε, κατά απόλυτη τιμή, μεταξύ 1,2 – 7,3 % για όλους τους χρόνους. Με βάση τους υπολογιζόμενους δείκτες άμεσης σύγκρισης καμπυλών τα προφίλ διάλυσης τόσο για την συνολική όσο και για την διαλυμένη ποσότητα δεν διαφέρουν ($f_{1,area} = 0,072$, $\xi_1 = 0,036$, $\xi_2 = 0,047$ και $f_{1,area} = 0,043$, $\xi_1 = 0,022$, $\xi_2 = 0,022$ αντίστοιχα).

Γ.1.3 Δισκία πιογλιταζόνης

Η πιογλιταζόνη χρησιμοποιήθηκε με τη μορφή του εμπορικά διαθέσιμου δισκίου και προστίθεται σε 250 ml FaSSGF επιπέδου προσομοίωσης III στο γαστρικό διαμέρισμα. Οι μετρούμενες συνολικές ποσότητες ανά όγκο στα δείγματα που λαμβάνονται σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα περιλαμβάνουν τόσο την διαλυμένη όσο και την αδιάλυτη (φάρμακο που εισέρχεται αδιάλυτο από το γαστρικό διαμέρισμα και αυτό που καθιζάνει με την είσοδό του στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα) ποσότητα ουσίας. Η διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο αποτελεί τη συγκέντρωση στο διήθημα μετά από διήθηση μέσω ηθμών μεγέθους πόρων 0,2 μm . Στο Σχήμα Γ.3 φαίνονται οι λαμβανόμενες τιμές και με τις δύο διατάξεις.



Σχήμα Γ.3: Συνολική ποσότητα πιογλιταζόνης ανά όγκο (αδιάλυτο στερεό και διαλυμένη ποσότητα) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης στη διάταξη BioGIT [μαύροι κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και στην διάταξη μBioGIT [γκρι τετράγωνα, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)]. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα προσομοιωμένα δεδομένα που προέκυψαν από το μοντέλο μεταφοράς [θεωρητικές τιμές για ομοιογενή μεταφορά, διακεκομμένη γραμμή] και από την προσέγγιση του μοντέλου μεταφοράς [αναμενόμενες τιμές, λευκά τρίγωνα] (A). Διαλυμένη ποσότητα πιογλιταζόνης ανά όγκο στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στη διάταξη BioGIT [λευκοί κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και στην διάταξη μBioGIT [λευκά τετράγωνα, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] (B).

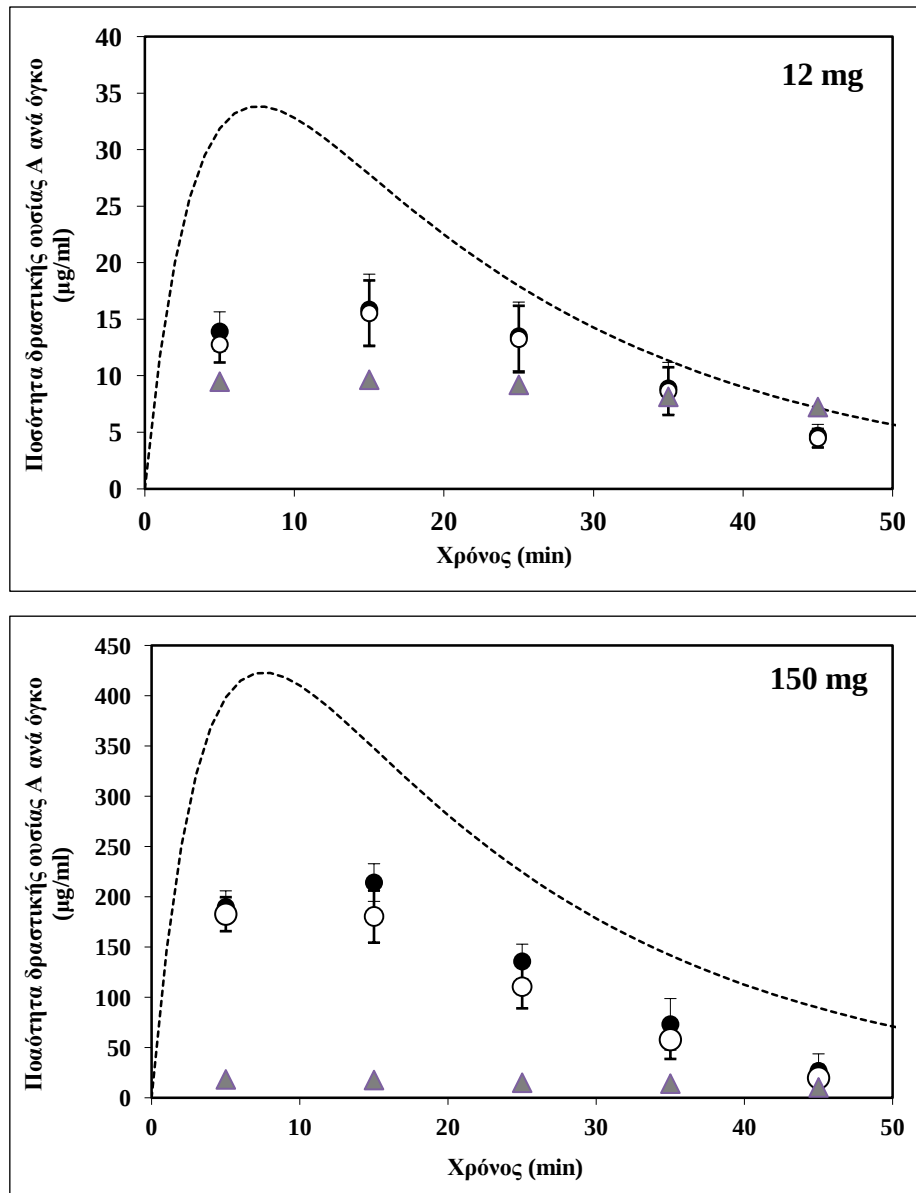
Όπως και στην περίπτωση της κετοκοναζόλης, οι δύο διατάξεις δίνουν παρόμοιες συνολικές και διαλυμένες ποσότητες ανά όγκο, με πολύ καλή επαναληψιμότητα. Η % MRD για τα 15 - 55 λεπτά κυμάνθηκε, κατά απόλυτη τιμή, μεταξύ 2,7 – 8,2 % για την συνολική ποσότητα ανά όγκο και μεταξύ 1,9 – 3,5 % για την διαλυμένη. Στο δείγμα των 5 λεπτών παρατηρήθηκαν αποκλίσεις 26 % και 22 % για την συνολική και διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο αντίστοιχα. Τέλος, η ομοιότητα των δύο καμπυλών επιβεβαιώθηκε και με δείκτες άμεσης σύγκρισης καμπυλών και για τις δύο ποσότητες ($f_{1,area} = 0,097$, $\xi_1 = 0,047$, $\xi_2 = 0,059$ για την συνολική και $f_{1,area} = 0,055$, $\xi_1 = 0,028$, $\xi_2 = 0,044$ για την διαλυμένη).

Γ.2 *In vitro* προσομοίωση των συγκεντρώσεων στον ανώτερο εντερικό αυλό με την διάταξη BioGIT για άμορφες στερεές διασπορές των δραστικών ουσιών Α και Β.

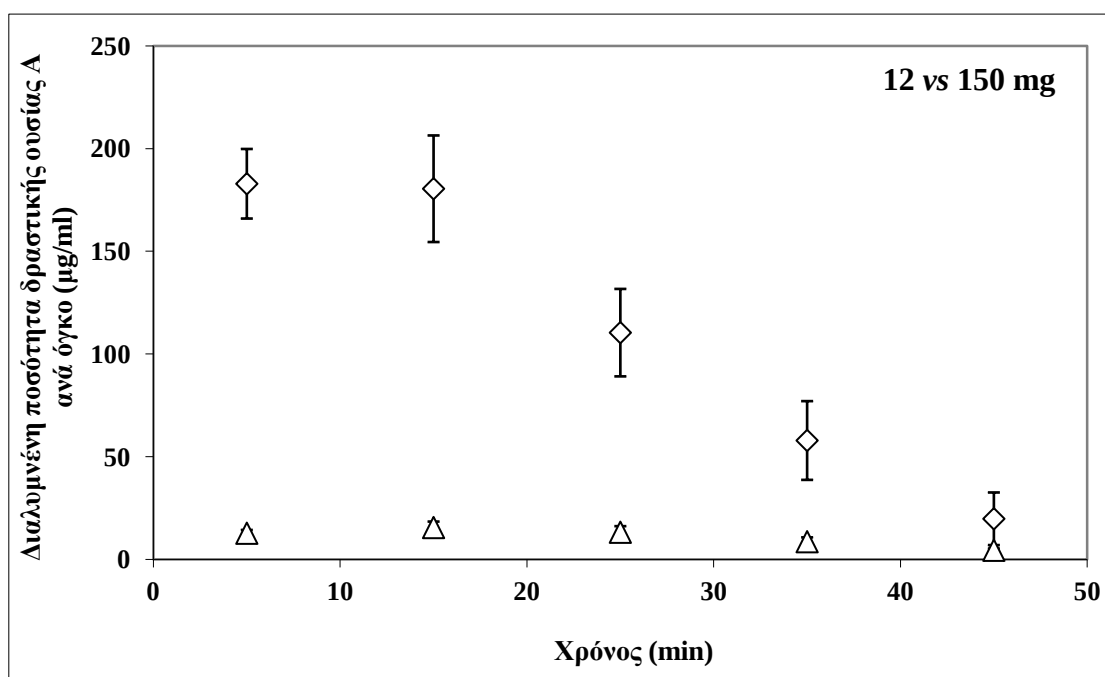
Προκαταρκτικά πειράματα για έλεγχο προσρόφησης ηθμών, βελτιστοποίηση χειρισμών δείγματος και μελέτη χρόνου εξισορρόπησης διαλυτότητας για τις δραστικές ουσίες Α και Β παρουσιάζονται αναλυτικά στα Παραρτήματα Π.7, Π.8 και Π.9 αντίστοιχα. Επίσης, τα πρωτογενή δεδομένα των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα Π.6.

Γ.2.1 Προϊόν στερεής διασποράς δραστικής ουσίας Α

Εξετάστηκε η ενδοαυλική συμπεριφορά δύο δόσεων προϊόντος στερεής διασποράς της δραστικής ουσίας Α (12 mg και 150 mg) με την διάταξη BioGIT. Η συνολική και η διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας ανά όγκο στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα καθώς και η διαλυτότητα κορεσμού της σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας παρουσιάζονται στο Σχήμα Γ.4 και για τις δύο δόσεις. Στο Σχήμα Γ.5 παρουσιάζονται συγκριτικά οι συγκεντρώσεις κάθε δείγματος για τις δύο δόσεις της δραστικής ουσίας.



Σχήμα Γ.4: Συνολική ποσότητα ανά όγκο [μαύροι κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)], διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο [λευκοί κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και διαλυτότητα κορεσμού [γκρι τετράγωνα] για τις δόσεις των 12 και 150 mg της δραστικής ουσίας Α στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης στη διάταξη BioGIT. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα προσομοιωμένα δεδομένα που προέκυψαν από το μοντέλο μεταφοράς [θεωρητικές τιμές για ομοιογενή μεταφορά, διακεκομμένη γραμμή].

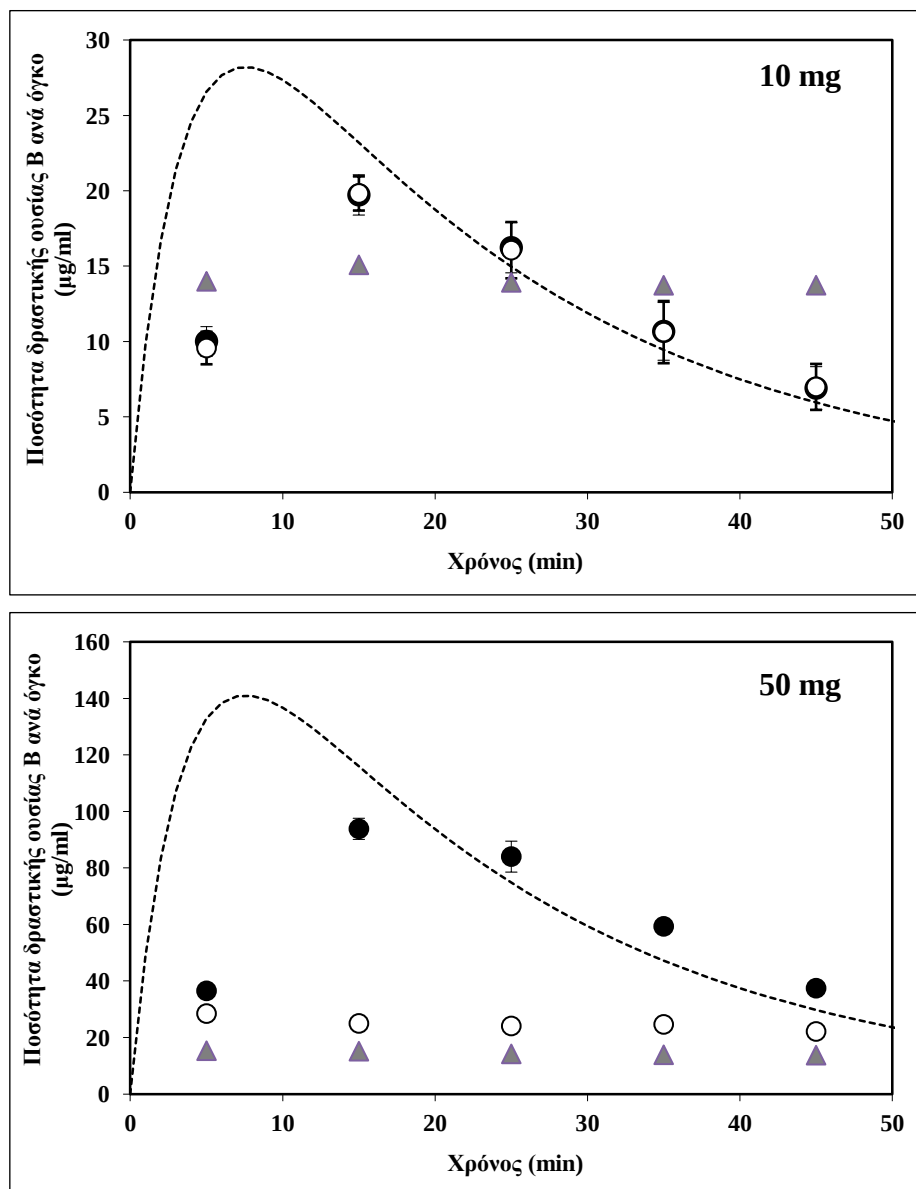


Σχήμα Γ.5: Διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας Α ανά όγκο για την δόση των 150 mg [λευκοί ρόμβοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και την δόση των 12 mg [λευκά τρίγωνα, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης στη διάταξη BioGIT.

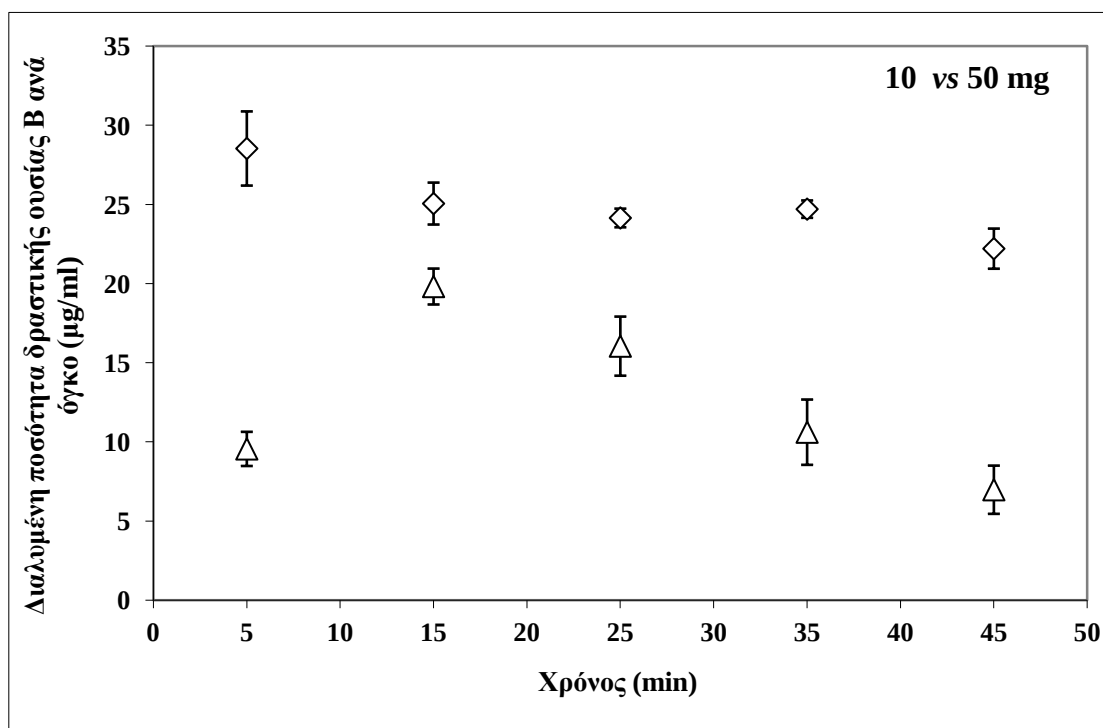
Όπως φαίνεται στο Σχήμα Γ.4, στη δόση των 12 mg η ουσία είναι σχεδόν πλήρως διαλυμένη σε όλους τους χρόνους δειγματοληψίας. Η συγκέντρωση στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα παρατηρούμε ότι είναι ελαφρώς υπέρκορη μέχρι και τα 30 λεπτά, ακολουθώντας την τιμή της συνολικής ποσότητας. Στην δόση των 150 mg στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα υπάρχει και αδιάλυτη ουσία, είτε στερεά που εισέρχονται αδιάλυτα από το γαστρικό διαμέρισμα είτε φάρμακο που καθιζάνει στο περιβάλλον του δωδεκαδακτύλου. Οι συγκεντρώσεις είναι σταθερά υπέρκορες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, και συγκριτικά αρκετά υψηλότερες από αυτές της χαμηλής δόσης του φαρμάκου (12 mg).

Γ.2.2 Προϊόν στερεής διασποράς δραστικής ουσίας Β

Αντίστοιχα διαγράμματα παρουσιάζονται στη συνέχεια και για δύο δόσεις (10 και 50 mg) προϊόντος στερεής διασποράς της δραστικής ουσίας Β (Σχήματα Γ.6 και Γ.7).



Σχήμα Γ.6: Συνολική ποσότητα ανά όγκο [μαύροι κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)], διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο [λευκοί κύκλοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και διαλυτότητα κορεσμού [γκρι τρίγωνα] για τις δόσεις των 10 και 50 mg της δραστικής ουσίας Β στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης στη διάταξη BioGIT. Στο διάγραμμα απεικονίζονται και τα προσομοιωμένα δεδομένα που προέκυψαν από το μοντέλο μεταφοράς [θεωρητικές τιμές για ομοιογενή μεταφορά, διακεκομμένη γραμμή].



Σχήμα Γ.7: Διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας B ανά όγκο για την δόση των 50 mg [λευκοί ρόμβοι, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] και την δόση των 10 mg [λευκά τρίγωνα, μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)] στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης στη διάταξη BioGIT.

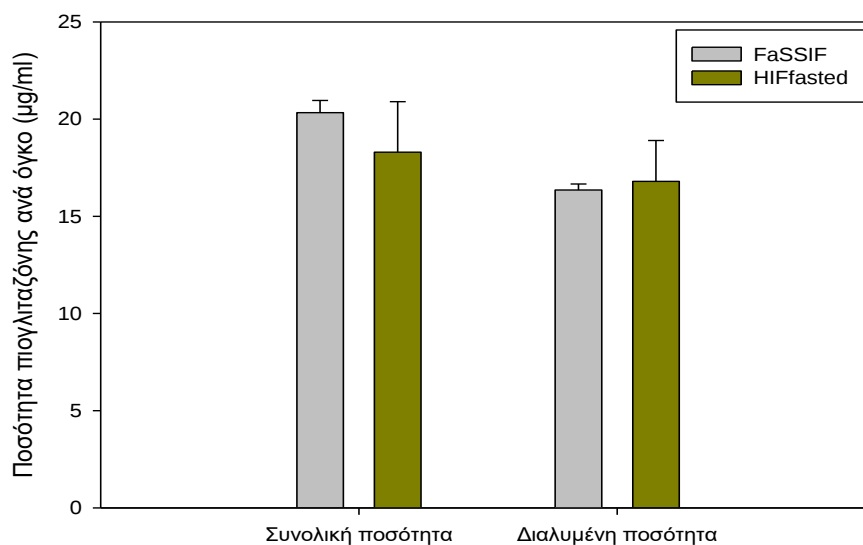
Όπως φαίνεται στο Σχήμα Γ.6, η χαμηλή δόση της δραστικής ουσίας B (10 mg) βρίσκεται πλήρως διαλυμένη καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, στα δείγματα των 15 και 25 λεπτών, στα οποία η ολική ποσότητα ουσίας στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα είναι μεγαλύτερη από την διαλυτότητα κορεσμού της, το διάλυμα διατηρεί τις συγκεντρώσεις σε υπέρκορη κατάσταση. Όσον αφορά την υψηλή δόση των 50 mg, οι συγκεντρώσεις παραμένουν συνεχώς υπέρκορες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, σε μία σχεδόν σταθερή τιμή ($\approx 25 \mu\text{g/ml}$) ελαφρώς μεγαλύτερη της διαλυτότητας κορεσμού ($\approx 15 \mu\text{g/ml}$).

Γ.3 Σύγκριση συμπεριφοράς λιπόφιλων φαρμάκων σε περιβάλλον μέσου προσομοίωσης δωδεκαδακτύλου (FaSSIF) και αναρροφηθέντων εντερικών υγρών (HIF_{fasted}) με τη διάταξη “20-30 min one-step”.

Οι δραστικές ουσίες που εξετάστηκαν με την διάταξη “20-30 min one-step”, είναι η πιογλιταζόνη, η δραστική ουσία Α (δόσεις των 12 και 150 mg) και η δραστική ουσία Β (δόσεις των 10 και 50 mg). Στους Πίνακες Γ.1 - Γ.5 παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της συνολικής και διαλυμένης ποσότητας ουσίας ανά όγκο καθώς και το κλάσμα της στερεής ουσίας ανά όγκο (SF-Solid Fraction) για τα δείγματα που λαμβάνονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” τόσο κατά τα πειράματα με FaSSIF όσο και με HIF_{fasted}. Στα Σχήματα Γ.8 - Γ.12 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι συνολικές και διαλυμένες ποσότητες ανά όγκο για κάθε εξεταζόμενη ουσία. Στις περιπτώσεις που οι τιμές απέτυχαν κατά την στατιστική δοκιμασία t, σημειώνεται πάνω στο διάγραμμα η τιμή του συντελεστή P (<0,05). Αναλυτικά τα πρωτογενή δεδομένα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Π.10.

Πίνακας Γ.1: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (n=3) για την συνολική και διαλυμένη ποσότητα πιογλιταζόνης ανά όγκο καθώς και το κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται στα 25 λεπτά από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” σε περιβάλλον FaSSIF (επιπέδου προσομοίωσης II) και HIF_{fasted}.

Χρόνος	Μέσο διάλυσης	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο (SF, Solid Fraction)
(min)	(δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα)	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
25	FaSSIF	20,33±0,63	16,35 ± 0,31	0,196 ± 0,026
	HIF _{fasted}	18,3±2,6	16,8 ± 2,1	0,081 ± 0,017

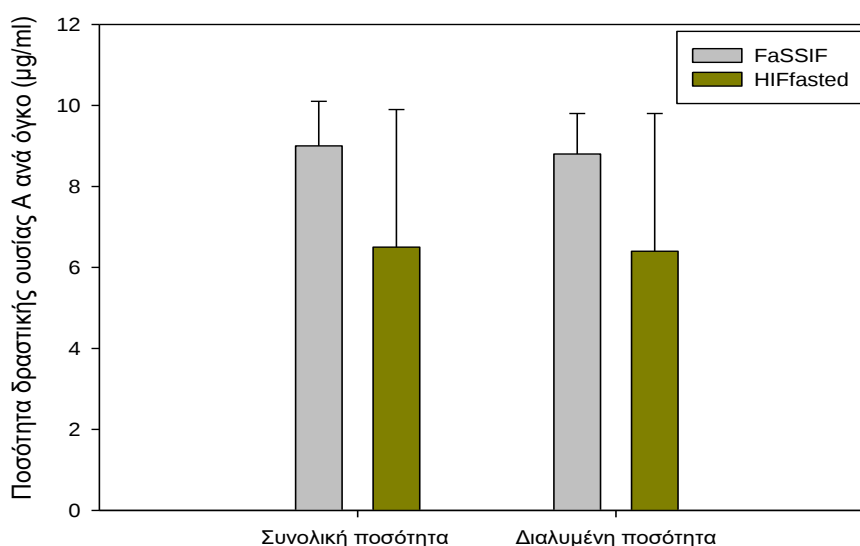


Σχήμα Γ.8: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα πιογλιταζόνης (δόση 15 mg) ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” στα πειράματα με μέσο διάλυσης FaSSIF [γκρί ραβδογράμματα] και HIF_{fasted} [πράσινα ραβδογράμματα].

Τόσο για την συνολική όσο και για την διαλυμένη ποσότητα πιογλιταζόνης ανά όγκο, μετά από στατιστικό παραμετρικό έλεγχο με δοκιμασία t (unpaired t-test), οι τιμές μεταξύ FaSSIF και HIF_{fasted} δεν εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P=0,262$ και $P=0,737$ αντίστοιχα). Συγκρίθηκε και το κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο στα δύο μέσα και η δοκιμασία έδειξε στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο μέσων ($P=0,003$).

Πίνακας Γ.2: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (n=3) για την συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας A (δόση 12 mg) ανά όγκο καθώς και το κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται στα 25 λεπτά από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” σε περιβάλλον FaSSIF (επιπέδου προσομοίωσης II) και HIF_{fasted}.

Χρόνος	Μέσο διάλυσης	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο (SF, Solid Fraction)
(min)	(δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα)	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
25	FaSSIF	9,0 ± 1,1	8,8 ± 1,0	0,0168 ± 0,0085
	HIF _{fasted}	6,5 ± 3,4	6,4 ± 3,4	0,0120 ± 0,0048

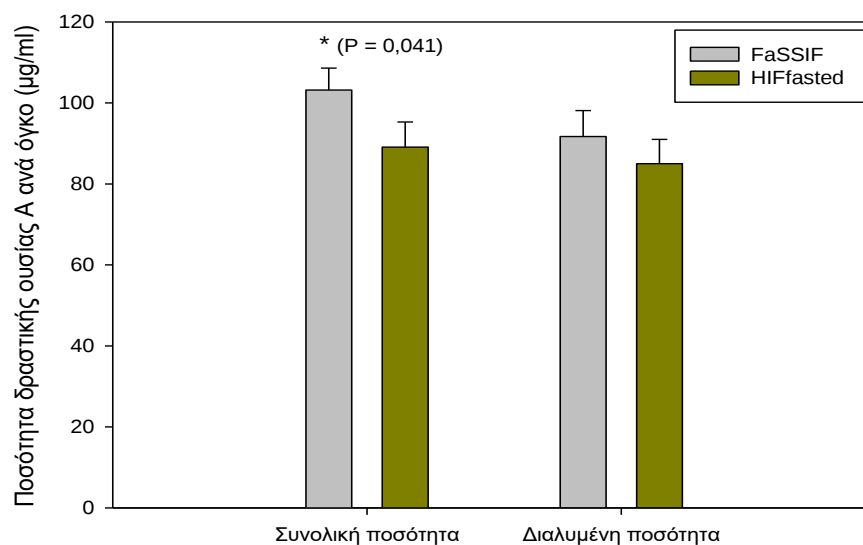


Σχήμα Γ.9: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας A (δόση 12 mg) ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” στα πειράματα με μέσο διάλυσης FaSSIF [γκρί ραβδογράμματα] και HIF_{fasted} [πράσινα ραβδογράμματα].

Για την δόση των 12 mg, η δραστική ουσία A φαίνεται να εμφανίζει ίδια συμπεριφορά στα δύο μέσα. Βρέθηκε να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της συνολικής και διαλυμένης ποσότητας ουσίας ανά όγκο ($P=0,290$ και $P=0,297$ αντίστοιχα) καθώς και των κλασμάτων στερεής ουσίας ανά όγκο μεταξύ των δύο μέσων ($P=0,448$).

Πίνακας Γ.3: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση ($n=3$) για την συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας A (δόση 150 mg) ανά όγκο καθώς και το κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται στα 25 λεπτά από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” σε περιβάλλον FaSSIF (επιπέδου προσομοίωσης II) και HIF_{fasted}.

Χρόνος	Μέσο διάλυσης	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο (SF, Solid Fraction)
(min)	(δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα)	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
25	FaSSIF	103,2 ± 5,4	91,7 ± 6,4	0,111 ± 0,057
	HIF _{fasted}	89,1 ± 6,2	85,0 ± 6,0	0,0461 ± 0,0068

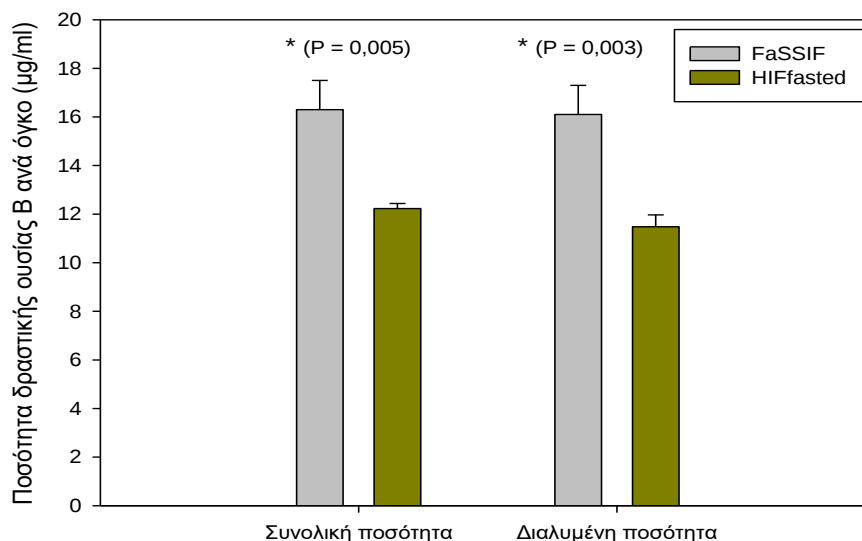


Σχήμα Γ.10: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας A (δόση 150 mg) ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” στα πειράματα με μέσο διάλυσης FaSSIF [γκρί ραβδογράμματα] και HIF_{fasted} [πράσινα ραβδογράμματα].

Για την υψηλή δόση της δραστικής ουσίας A, παρατηρείται μη στατιστικά σημαντική διαφορά για τις διαλυμένες ποσότητες ουσίας ανά όγκο ($P=0,256$), ενώ οι συνολικές ποσότητες ουσίας ανά όγκο φαίνεται να διαφέρουν ($P=0,041$). Όμως, κατά τον έλεγχο των κλασμάτων στερεής ουσίας μεταξύ των δύο μέσων, η διαφορά τους δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($P=0,123$).

Πίνακας Γ.4: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (n=3) για την συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας B (δόση 10 mg) ανά όγκο καθώς και το κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται στα 25 λεπτά από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” σε περιβάλλον FaSSIF (επιπέδου προσομοίωσης II) και HIF_{fasted}.

Χρόνος	Μέσο διάλυσης	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο (SF, Solid Fraction)
(min)	(δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα)	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
25	FaSSIF	16,3 ± 1,2	16,1 ± 1,2	0,011 ± 0,012
	HIF _{fasted}	12,23 ± 0,21	11,48 ± 0,49	0,062 ± 0,029

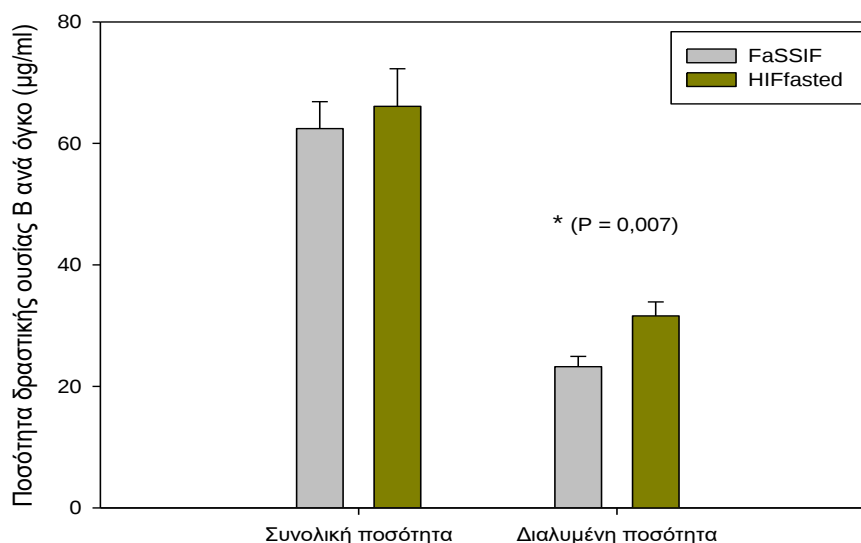


Σχήμα Γ.11: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας B (δόση 10 mg) ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” στα πειράματα με μέσο διάλυσης FaSSIF [γκρί ραβδογράμματα] και HIF_{fasted} [πράσινες ραβδογράμματα].

Κατά την εξέταση της χαμηλής δόσης της δραστικής ουσίας B (10 mg), τόσο η συνολική όσο και η διαλυμένη ποσότητα ουσίας ανά όγκο εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο μέσων διάλυσης. Επίσης, κατά την σύγκριση των κλασμάτων στερεής ουσίας, η διαφορά βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ($P=0,049$).

Πίνακας Γ.5: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση ($n=3$) για την συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας B (δόση 50 mg) ανά όγκο καθώς και το κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται στα 25 λεπτά από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” σε περιβάλλον FaSSIF (επιπέδου προσομοίωσης II) και HIF_{fasted}.

Χρόνος	Μέσο διάλυσης	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο (SF, Solid Fraction)
(min)	(δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα)	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
25	FaSSIF	62,4 ± 4,4	23,2 ± 1,7	0,625 ± 0,056
	HIF _{fasted}	66,1 ± 6,2	31,6 ± 2,3	0,517 ± 0,072



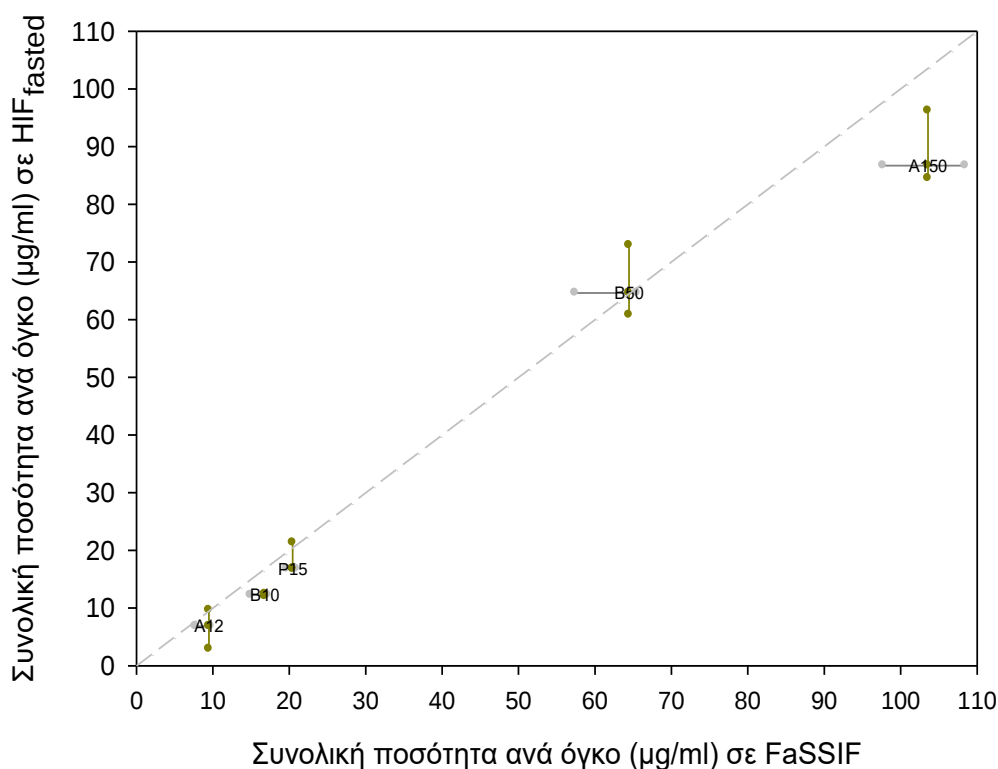
Σχήμα Γ.12: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας B (δόση 50 mg) ανά όγκο για τα δείγματα που λαμβάνονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” στα πειράματα με μέσο διάλυσης FaSSIF [γκρί ραβδογράμματα] και HIF_{fasted} [πράσινα ραβδογράμματα].

Τέλος, για την υψηλή δόση της δραστικής ουσίας B στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται για την συνολική ποσότητα ουσίας ($P=0,451$), ενώ παρατηρείται για την διαλυμένη ποσότητα ($P=0,007$). Κατά την εξέταση των κλασμάτων στερεής ουσίας ανά όγκο, μεταξύ των δύο μέσων, η διαφορά δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική ($P=0,109$).

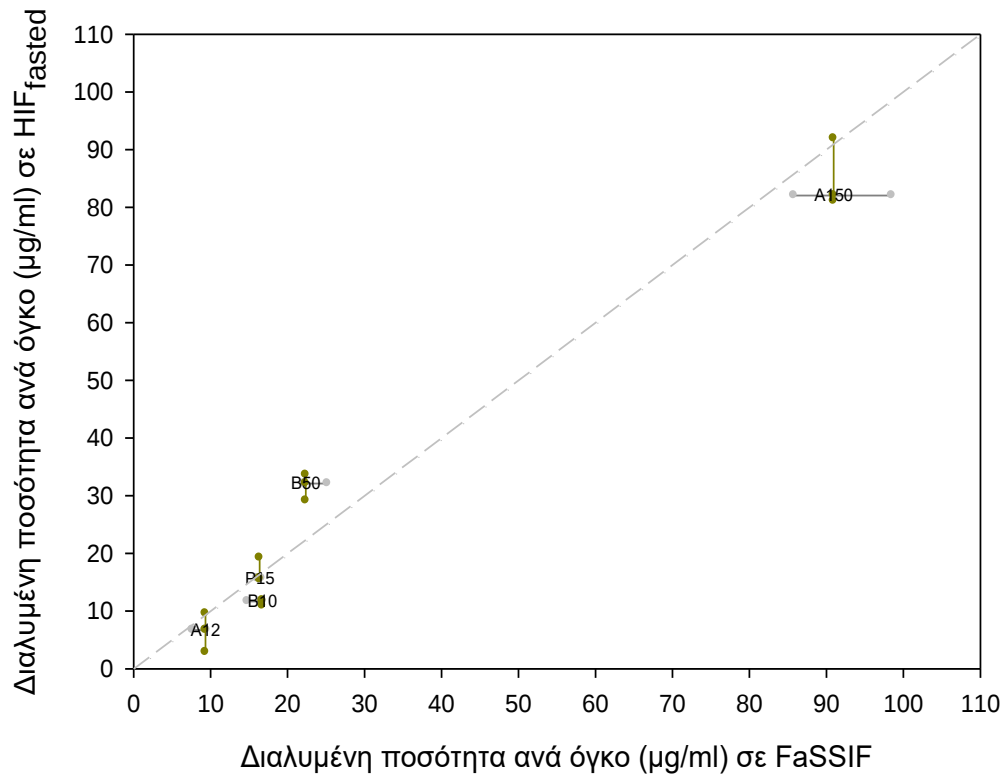
Όπως φαίνεται από τα Σχήματα Γ.8 έως Γ.12 καθώς και από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, δεν φαίνεται να υπάρχει μια σαφής τάση για όλα τα φάρμακα, δηλαδή πάντα μεγαλύτερες ποσότητες ή κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο στο FaSSIF παρά στα HIF_{fasted} (αυτό παρατηρείται μόνο σε 4 από τις 15 περιπτώσεις). Ακόμη και για το ίδιο φάρμακο, ανάλογα με τη δόση παρατηρούνται διαφορετικά αποτελέσματα. Σε κάποιες περιπτώσεις, παρατηρούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ή κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο στα HIF_{fasted} (2 από τις 15). Στις υπόλοιπες 8 από τις 15 περιπτώσεις, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ FaSSIF και HIF_{fasted}. Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρήθηκε χαμηλή τιμή στην ισχύ της δοκιμασίας.

Επιχειρήθηκε και η συνολική στατιστική ανάλυση για τα 5 φάρμακα (δόσεις) μαζί, για έλεγχο πιθανής διαφοράς ανάμεσα στα δύο μέσα, με μη παραμετρική στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney Rank Sum Test). Δεν βρέθηκε καμιά στατιστικά σημαντική διαφορά στη συνολική ποσότητα, διαλυμένη ποσότητα και κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο ανάμεσα στα δύο μέσα.

Στο Σχήμα Γ.13 φαίνεται η συνολική ποσότητα ανά όγκο στο FaSSIF σε σχέση με τη συνολική ποσότητα ανά όγκο στα HIF_{fasted} για τα πέντε φάρμακα (δόσεις). Αντίστοιχα, στο Σχήμα Γ.14 δίνεται η διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο στο FaSSIF σε σχέση με τη διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο στα HIF_{fasted} για τα πέντε φάρμακα (δόσεις).



Σχήμα Γ.13: Συνολική ποσότητα ανά όγκο στο FaSSIF σε σχέση με τη συνολική ποσότητα ανά όγκο στο HIF_{fasted} για τα πέντε φάρμακα (δόσεις). Οι κωδικοί ανά φάρμακο είναι: P15: Πιογλιταζόνη (15 mg), A12: δραστική ουσία A (12 mg), A150: δραστική ουσία A (150 mg), B10: δραστική ουσία B (10 mg), B50: δραστική ουσία B (50 mg).



Σχήμα Γ.14: Διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο στο FaSSIF σε σχέση με τη διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο στα HIF_{fasted} για τα πέντε φάρμακα (δόσεις). Οι κωδικοί ανά φάρμακο είναι, P15: Πιογλιταζόνη (15 mg), A12: δραστική ουσία A (12 mg), A150: δραστική ουσία A (150 mg), B10: δραστική ουσία B (10 mg), B50: δραστική ουσία B (50 mg).

Όπως φαίνεται από τα Σχήματα Γ.13 και Γ.14, η απεικόνιση των ποσοτήτων των φαρμάκων στα δύο μέσα είναι πολύ κοντά στην ευθεία με κλίση ίση με τη μονάδα. Αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει μεγάλη και συστηματική διαφοροποίηση των ποσοτήτων των φαρμάκων που μελετήθηκαν ανά όγκο στα δύο μέσα.

Γ.4 Αξιολόγηση μεγέθους σωματιδίων της δραστικής ουσίας Β στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε πειράματα με τις διατάξεις BioGIT και “20-30 min one-step”.

Τα πρωτογενή δεδομένα των συγκεντρώσεων που λαμβάνονται μετά από διήθηση μέσω κάθε διαφορετικού μεγέθους πόρων ηθμό παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα Π.11.

Στους Πίνακες Γ.6 - Γ.9 παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του % ποσοστού σωματιδίων για την κάθε τάξη μεγέθους, κατά τα πειράματα με την διάταξη BioGIT και συγκριτικά, στα 25 λεπτά, και με τις δύο διατάξεις σε δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον FaSSIF και HIF_{fasted} και για τις δύο δόσεις (10 και 50 mg). Στα Σχήματα Γ.15 και Γ.16 παρουσιάζονται διαγραμματικά τα παραπάνω αποτελέσματα.

Πίνακας Γ.6: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του % ποσοστού σωματιδίων για την κάθε τάξη μεγέθους, κατά τα πειράματα με την διάταξη BioGIT, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετείται δόση δραστικής ουσίας Β ίση με 10 mg.

Χρόνος (min)	% Ποσοστό σωματιδίων (Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)			
	> 1 μm	[1 μm-0,45 μm]	[0,45 μm- 0,1 μm]	<0,1 μm
5	4,16±0,99	0,09±0,10	0,80±0,69	95,5±2,6
15	0,15±0,15	0	0,21±0,37	99,74±0,45
25	0,61±0,59	0,019±0,027	1,1±1,1	98,87±1,52
35	0,87±0,93	0,040±0,045	0,24±0,34	99,06±0,99
45	0	0	0	100

Πίνακας Γ.7: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του % ποσοστού σωματιδίων για την κάθε τάξη μεγέθους, κατά τα πειράματα με την διάταξη BioGIT, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετείται δόση δραστικής ουσίας Β ίση με 50 mg.

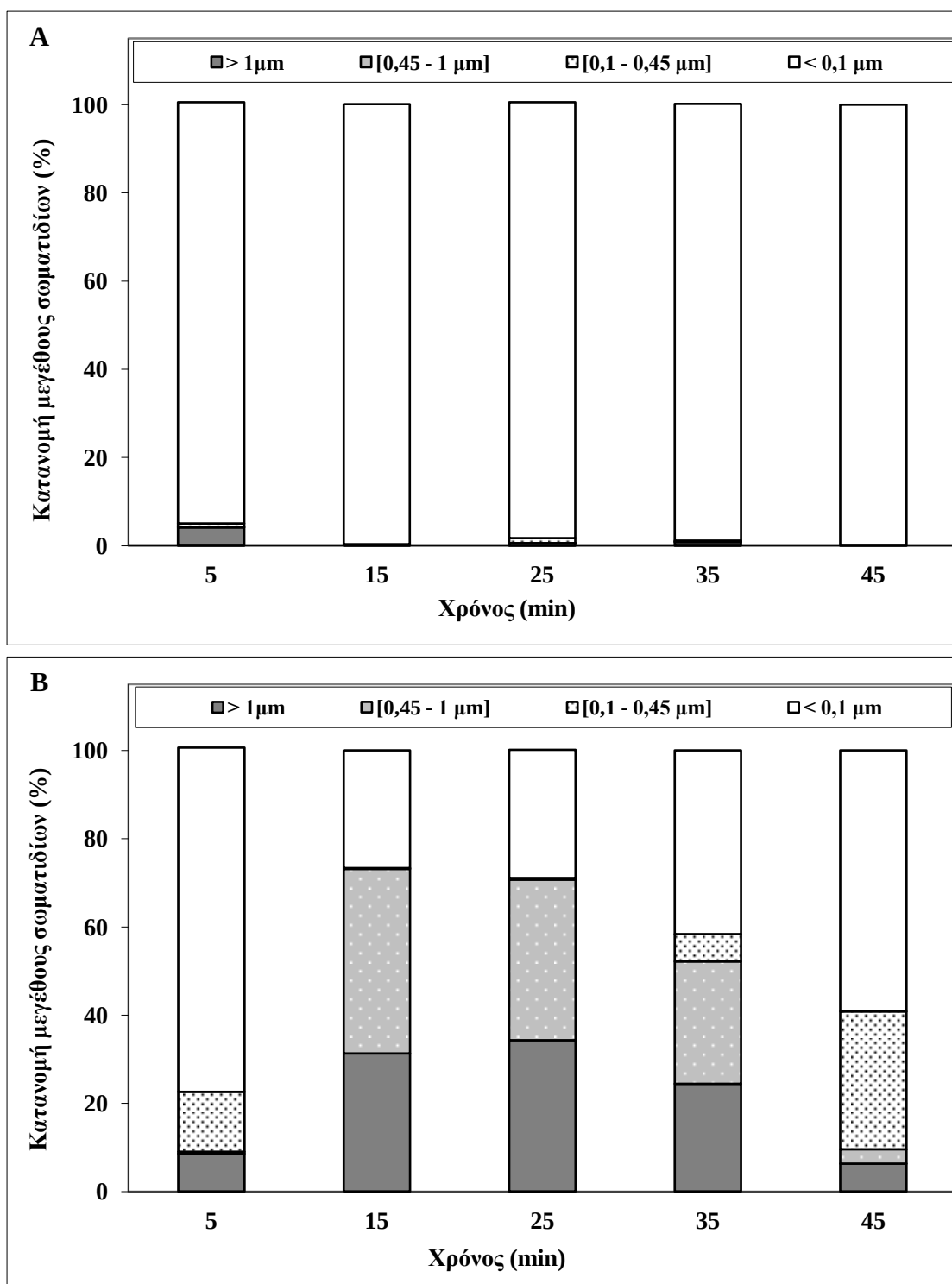
Χρόνος (min)	% Ποσοστό σωματιδίων (Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)			
	>1 μm	[1 μm -0,45 μm]	[0,45 μm -0,1 μm]	<0,1 μm
5	8,54±5,07	0,43±0,37	13,6±10,4	78,0±6,5
15	31,3±2,9	41,9±3,4	0,22±0,35	26,68±0,45
25	34,3±4,9	36,4±2,3	0,39±0,55	29,1±1,8
35	24,4±4,5	27,7±4,5	6,2±7,6	41,6±2,2
45	6,33±1,02	3,2±1,6	31,23±0,88	59,2±2,8

Πίνακας Γ.8: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του % ποσοστού σωματιδίων για την κάθε τάξη μεγέθους, σε δειγματοληψία στα 25 λεπτά με την διάταξη BioGIT (με μέσο διάλυσης FaSSIF) και την διάταξη “20-30 min one-step” (με μέσο διάλυσης FaSSIF και HIF_{fasted}), όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετείται δόση δραστικής ουσίας Β ίση με 10 mg.

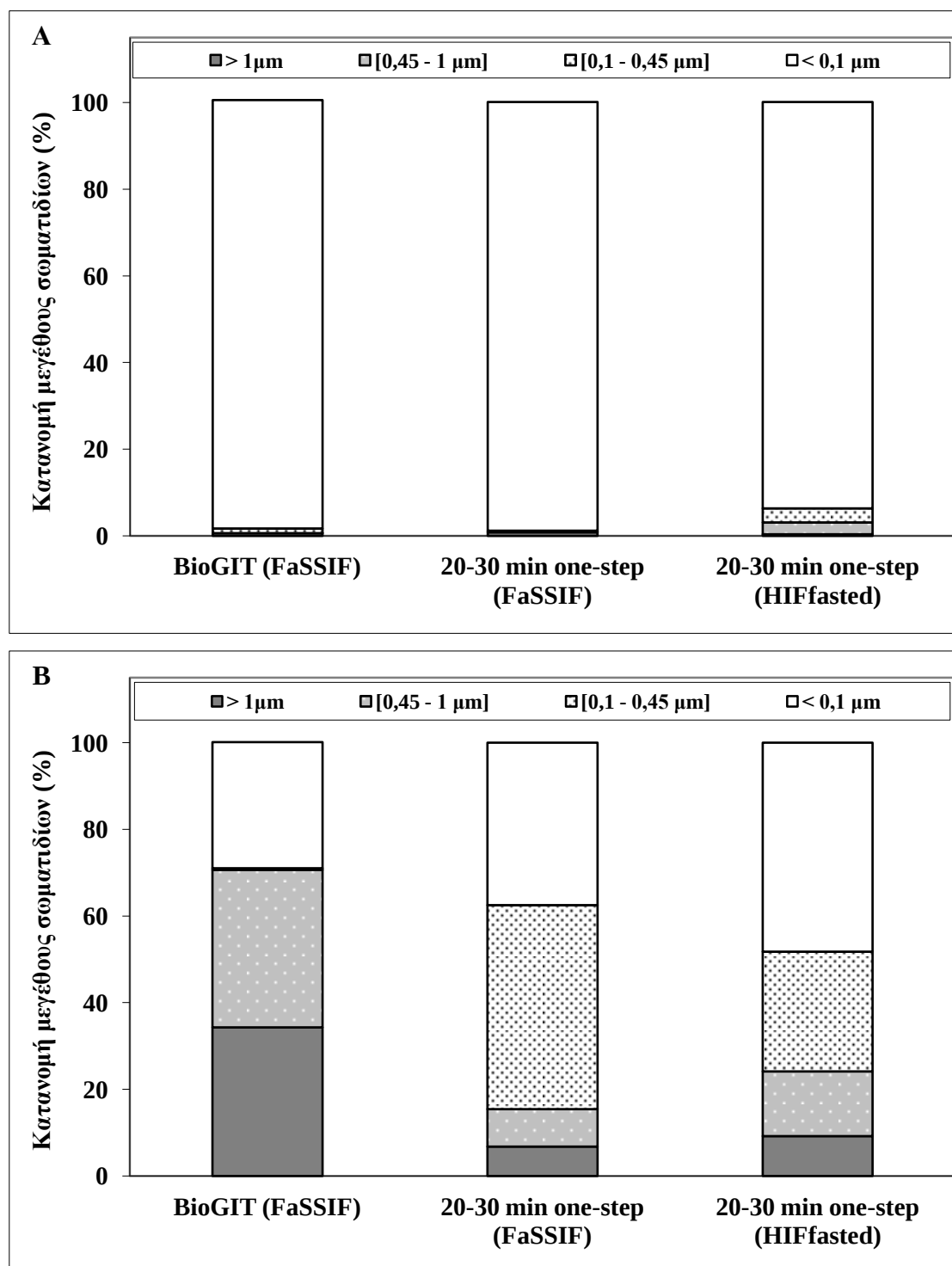
Χρόνος (min)	Διάταξη	Μέσο	% Ποσοστό σωματιδίων (Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)			
			>1 μm	[1 μm - 0,45 μm]	[0,45 μm - 0,1 μm]	<0,1 μm
25	BioGIT	FaSSIF	0,61±0,59	0,019±0,027	1,1±1,1	98,9±1,5
	one step	FaSSIF	0,84±0,97	0,10±0,14	0,27±0,16	98,9±1,2
		HIF _{fasted}	0,38±0,64	2,75±0,98	3,2±1,3	93,8±2,9

Πίνακας Γ.9: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του % ποσοστού σωματιδίων για την κάθε τάξη μεγέθους, σε δειγματοληψία στα 25 λεπτά με την διάταξη BioGIT (με μέσο διάλυσης FaSSIF) και την διάταξη “20-30 min one-step” (με μέσο διάλυσης FaSSIF και HIF_{fasted}), όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετείται δόση δραστικής ουσίας B ίση με 50 mg.

Χρόνος (min)	Διάταξη	Μέσο	% Ποσοστό σωματιδίων (Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)			
			>1 μm	[1 μm - 0,45 μm]	[0,45 μm - 0,1 μm]	<0,1 μm
25	BioGIT	FaSSIF	34,3±4,9	36,4±2,3	0,39±0,55	29,1±1,8
	one step	FaSSIF	6,81±0,88	8,60±3,06	47,1±3,6	37,5±5,6
		HIF _{fasted}	9,2±10,0	14,9±3,7	27,6±3,9	48,3±7,2



Σχήμα Γ.15: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στα δείγματα από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διατάξης BioGIT σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετείται δόση δραστικής ουσίας B ίση με 10 mg (A) ή 50 mg (B).



Σχήμα Γ.16: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στα δείγματα των 25 λεπτών με την διάταξη BioGIT (FaSSIF) και την διάταξη “20-30 min one-step” (FaSSIF και HIF_{fasted}), όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετείται δόση δραστικής ουσίας B ίση με 10 mg (A) ή 50 mg (B).

Στο σχήμα Γ.15 παρατηρείται ότι η χαμηλή δόση της δραστικής ουσίας B είναι σχεδόν πλήρως διαλυμένη καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος BioGIT. Όσον αφορά την υψηλή δόση (50 mg) παρατηρείται αύξηση του ποσοστού και του μεγέθους των σωματιδίων κυρίως στους χρόνους δειγματοληψίας 15-35 λεπτών. Κατά την έναρξη του πειράματος (δείγμα στα 5 λεπτά) το ποσοστό στερεών σωματιδίων είναι χαμηλό, με διαμέτρους σωματιδίων να κυμαίνονται και στην τάξη μεγέθους $> 1 \mu\text{m}$. Η αύξηση του μεγέθους σωματιδίων με την πάροδο του χρόνου (δείγματα στα 15 και 25 λεπτά) πιθανόν να οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό στερεών στο μέσο, τα οποία λειτουργούν ως πυρήνες κρυστάλλωσης, ευνοώντας έτσι τη συνένωση προς μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια ($> 0,45 \mu\text{m}$). Στο τέλος του πειράματος (δείγμα στα 45 λεπτά), τα μεγέθη αρχίζουν και πάλι να μειώνονται ($< 0,45 \mu\text{m}$).

Στο σχήμα Γ.16 παρουσιάζονται συγκριτικά τα σωματίδια στο δείγμα των 25 λεπτών στις διατάξεις BioGIT (με μέσο διάλυσης FaSSIF) και “20-30 min one-step” (με μέσο διάλυσης FaSSIF ή HIF_{fasted}). Στην χαμηλή δόση (Διάγραμμα A), σχεδόν όλη η ποσότητα ουσίας στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα είναι διαλυμένη και στα δύο μέσα στην διάταξη “20-30 min one-step”, όπως παρατηρείται και στην διάταξη BioGIT. Για την υψηλή δόση, το συνολικό ποσοστό και το μέγεθος των στερεών μεταξύ των δύο διατάξεων παρουσιάζουν διαφορά. Συγκεκριμένα, στην διάταξη BioGIT παρατηρείται μεγαλύτερο συνολικό ποσοστό στερεών τα οποία εμφανίζουν και μεγαλύτερα μεγέθη ($> 0,45 \mu\text{m}$) σε σύγκριση με τη διάταξη “20-30 min one-step” ($< 0,45 \mu\text{m}$). Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η διάταξη BioGIT είναι ένα συνεχές σύστημα μελέτης γαστρεντερικής διάβασης, οπότε στο χρόνο δειγματοληψίας των 25 λεπτών, στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα πιθανόν να υπάρχουν και σωματίδια από προηγούμενους χρόνους (0-20 λεπτά). Αυτά τα στερεά πιθανόν αυξάνουν το συνολικό ποσοστό στερεών του μέσου καθώς και τις διαμέτρους τους λειτουργώντας ως πυρήνες κρυστάλλωσης.

Στα δεδομένα που συλλέχθηκαν με τη διάταξη “20-30 min one-step”, έγινε διπαραγοντική Ανάλυση Διασποράς για έλεγχο πιθανής διαφοροποίησης της κατανομής των διαφόρων μεγεθών σωματιδίων στα δύο μέσα (FaSSIF vs. HIF_{fasted}) και για τις δύο δόσεις του προϊόντος στερεής διασποράς της δραστικής ουσίας B (10 mg και 50 mg).

Η Ανάλυση Διασποράς, όσον αφορά τον κύριο παράγοντα “μέσο”, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τη σύγκριση FaSSIF vs. HIF_{fasted} και για τις δύο δόσεις. Η επίδραση όμως του κύριου παράγοντα δεν μπορεί να ερμηνευθεί ικανοποιητικά λόγω της ύπαρξης αλληλεπίδρασης των παραγόντων “μέσο” x “μέγεθος σωματιδίων”.

Με βάση τη στατιστική ανάλυση, παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά στα δύο μέσα διάλυσης, FaSSIF και HIF_{fasted}, όσον αφορά την παρουσία σωματιδίων μεγέθους $> 1 \mu\text{m}$ και για τις δύο δόσεις του προϊόντος στερεής διασποράς της δραστικής ουσίας B που μελετήθηκαν. Ειδικότερα όμως, ανάλογα με τη δόση της δραστικής ουσίας B, η στατιστική ανάλυση έδωσε τα πιο κάτω αποτελέσματα:

Δόση 10 mg: Υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση “μέσο” x “μέγεθος σωματιδίων”. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα μέσα FaSSIF vs. HIF_{fasted} για το μέγεθος σωματιδίων $1 - 0,45 \mu\text{m}$, $0,45 - 0,1 \mu\text{m}$ και για το μέγεθος σωματιδίων $< 0,1 \mu\text{m}$.

Δόση (50 mg): Υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση “μέσο” x “μέγεθος σωματιδίων”. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα μέσα FaSSIF vs. HIF_{fasted} για το μέγεθος σωματιδίων $0,45 - 0,1 \mu\text{m}$ και για το μέγεθος σωματιδίων $< 0,1 \mu\text{m}$.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην κατανομή των διαφόρων μεγεθών σωματιδίων στα δύο μέσα FaSSIF και HIF_{fasted} δεν ήταν προς την ίδια κατεύθυνση για τις δύο δόσεις του προϊόντος στερεής διασποράς της δραστικής ουσίας B που μελετήθηκαν. Ανάλογα με τη δόση, παρατηρήθηκε διαφορετική τάση στην κατανομή των διαφόρων μεγεθών των σωματιδίων. Συγκεκριμένα, στη δόση των 10 mg, παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό μικρού μεγέθους σωματιδίων ($< 0,1 \mu\text{m}$) στο FaSSIF σε σχέση με τα HIF_{fasted}. Η αντίθετη τάση παρατηρήθηκε στη μεγαλύτερη δόση των 50 mg, όπου το ποσοστό μικρού μεγέθους σωματιδίων ($< 0,1 \mu\text{m}$) ήταν υψηλότερο στα HIF_{fasted} σε σχέση με το FaSSIF. Τα πιο πάνω είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μετρήσεων της συγκέντρωσης του φαρμάκου στα δύο μέσα. Αντίθετη τάση μεταξύ των δύο διαφορετικών δόσεων της δραστικής ουσίας B παρατηρήθηκε και για το σχετικό ύψος του ποσοστού σωματιδίων στα δύο μέσα για το μέγεθος σωματιδίων $0,45 - 0,1 \mu\text{m}$.

Οι πιο πάνω παρατηρήσεις πιθανώς να σχετίζονται με παράγοντες που διαφοροποιούν τη σύσταση των δύο μέσων και που η επίδρασή τους να γίνεται πιο εμφανής ή ακόμη και να διαφοροποιείται με τη παρουσία υψηλότερης δόσης του φαρμάκου.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όσον αφορά τη μελέτη της αποτελεσματικότητας της διάταξης μικρής κλίμακας μBioGIT και την σύγκρισή του με την αρχική διάταξη στην οποία βασίστηκε (BioGIT), φαίνεται ότι οι δύο διατάξεις μπορούν να προβλέψουν με την ίδια αποτελεσματικότητα την ενδοαυλική συμπεριφορά ασθενών βάσεων. Το συμπέρασμα αυτό βασίστηκε τόσο σε υπολογισμό της %MRD για κάθε χρονικό σημείο, όσο και στη σύγκριση των δύο καμπυλών γαστρεντερικής μεταφοράς με δείκτες άμεσης σύγκρισης καμπυλών ($f_{1,area}$, ξ_1 και ξ_2). Έτσι, η διάταξη μBioGIT μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά αντί της διατάξεως BioGIT σε *in vitro* πειράματα μελέτης της γαστρεντερικής διάβασης φαρμάκων, όταν η ποσότητα της εξεταζόμενης φαρμακομορφής είναι περιορισμένη ή επιδιώκεται να μειωθούν οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι μέσω προσομοίωσης.

Η μελέτη των στερεών διασπορών των δραστικών ουσιών Α και Β με την διάταξη BioGIT έδειξε την αποτελεσματικότητα των φορέων HPMC-AS και HPMC αντίστοιχα, στην διατήρηση υπέρκορων συγκεντρώσεων καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της δραστικής ουσίας Α με φορέα HPMC-AS, η διαλυμένη ποσότητα ουσίας ανά όγκο αλλάζει κατά τη διάρκεια του πειράματος, εξαρτώμενη από την συνολική ποσότητα ουσίας στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα. Όσον αφορά την δραστική ουσία Β με φορέα HPMC, η διαλυμένη ποσότητα ουσίας ανά όγκο παραμένει σε μία σχεδόν σταθερή υπέρκορη τιμή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, μη-ακολουθώντας την τιμή της συνολικής ποσότητας.

Μελετήθηκε συγκριτικά η συμπεριφορά λιπόφιλων φαρμάκων σε περιβάλλον μέσου προσομοίωσης δωδεκαδακτύλου (FaSSIF) και αναρροφηθέντων εντερικών υγρών (HIF_{fasted}) με τη διάταξη “20-30 min one-step”. Η στατιστική δοκιμασία που έγινε για πιθανή διαφορά στη συνολική ποσότητα, στη διαλυμένη ποσότητα και στο κλάσμα στερεής ουσίας ανά όγκο ανάμεσα στα δύο μέσα (FaSSIF vs. HIF_{fasted}) για κάθε ένα από τα πέντε φάρμακα (δόσεις) έδειξε ότι δεν υπάρχει μια σαφής τάση (ίδια) για όλα τα φάρμακα. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Ακόμη και για το ίδιο φάρμακο, ανάλογα με τη δόση παρατηρούνται διαφορετικά αποτελέσματα. Η απεικόνιση της συνολικής ή της διαλυμένης ποσότητας ανά όγκο στο FaSSIF σε σχέση με τη συνολική ή τη

διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο στα HIF_{fasted} για τα πέντε φάρμακα (δόσεις) είναι πολύ κοντά στην ευθεία με κλίση ίση με τη μονάδα και κατά συνέπεια δεν φαίνεται να υπάρχει μεγάλη και συστηματική διαφοροποίηση των ποσοτήτων των φαρμάκων που μελετήθηκαν στα δύο μέσα.

Από την μελέτη της κατανομής μεγέθους στερεών σωματιδίων για το προϊόν στερεής διασποράς της δραστικής ουσίας B παρατηρούμε ότι κατά τη διάρκεια πειράματος με τη διάταξη BioGIT, τόσο ο αριθμός όσο και το μέγεθος των στερεών σωματιδίων αλλάζει. Συγκεκριμένα, στην αρχή του πειράματος τα σωματίδια στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα είναι λίγα με μεγέθη που κυμαίνονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στην περιοχή $< 0,45 \mu m$. Με την πάροδο του χρόνου, παρατηρείται μία τάση μετακίνησης προς μεγαλύτερης διαμέτρου σωματίδια ($> 0,45 \mu m$). Προς το τέλος το πειράματος παρατηρείται μία τάση μετατροπής των σωματιδίων πάλι σε μικρότερες διαμέτρους ($< 0,45 \mu m$). Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη περισσότερων στερεών σωματιδίων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά των χρόνους δειγματοληψίας 15-35 λεπτά τα οποία πιθανώς να λειτουργούν ως πυρήνες κρυστάλλωσης, οδηγώντας σε συνένωση αιωρούμενων στο μέσο σωματιδίων αυξάνοντας το μέγεθός τους.

Συγκρίνοντας το μέγεθος των στερεών σωματιδίων στα πειράματα με την διάταξη “20-30 min one-step”, με βάση τη στατιστική ανάλυση που έγινε για έλεγχο πιθανής διαφοροποίησης της κατανομής των διαφόρων μεγεθών σωματιδίων, παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά στα δύο μέσα, FaSSIF και HIF_{fasted} , όσον αφορά την παρουσία σωματιδίων μεγέθους $> 1 \mu m$ και για τις δύο δόσεις της δραστικής ουσίας B που μελετήθηκαν. Όμως, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα μέσα FaSSIF vs. HIF_{fasted} για το μέγεθος σωματιδίων $1 - 0,45 \mu m$, $0,45 - 0,1 \mu m$ και για το μέγεθος σωματιδίων $< 0,1 \mu m$ στη δόση των 10 mg, ενώ στατιστικά σημαντική διαφορά στα μέσα για το μέγεθος σωματιδίων $0,45 - 0,1 \mu m$ και για το μέγεθος σωματιδίων $< 0,1 \mu m$ παρατηρήθηκε στη δόση των 50 mg. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην κατανομή των διαφόρων μεγεθών σωματιδίων στα δύο μέσα FaSSIF και HIF_{fasted} δεν ήταν προς την ίδια κατεύθυνση για τις δυο δόσεις της δραστικής ουσίας B που μελετήθηκαν. Οι πιο πάνω παρατηρήσεις πιθανώς να σχετίζονται με παράγοντες που διαφοροποιούν τη σύσταση των δύο μέσων και που η επίδρασή τους να γίνεται πιο εμφανής ή ακόμη και να διαφοροποιείται με τη παρουσία υψηλότερης δόσης του φαρμάκου.

Τέλος, συγκρίνοντας το ποσοστό και το μέγεθος των σωματιδίων μεταξύ των δύο διατάξεων (BioGIT και “20-30min one-step”) όταν ως μέσο διάλυσης χρησιμοποιείται FaSSIF, για τον χρόνο δειγματοληψίας των 25 λεπτών, στην διάταξη BioGIT παρατηρείται μία ελαφρώς υψηλότερη παρουσία στερεών σωματιδίων μεγαλύτερης τάξης μεγέθους ($> 0,45 \mu\text{m}$). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το σύστημα BioGIT αποτελεί ένα συνεχές σύστημα μελέτης ενδοαυλικής συμπεριφοράς, οπότε, στον χρόνο δειγματοληψίας των 25 λεπτών πιθανόν να υπάρχουν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στερεά σωματίδια που έχουν μεταφερθεί σε προηγούμενους χρόνους. Τα σωματίδια αυτά μπορεί να λειτουργήσουν και ως πυρήνες κρυστάλλωσης οδηγώντας σε συνένωση (διάμετρος $> 0,45 \mu\text{m}$) και πιθανή καθίζηση σωματιδίων.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abuhelwa AY, Foster DJ, Upton RN. A quantitative review and meta-models of the variability and factors affecting oral drug absorption-part I: gastrointestinal pH *AAPS J.*, 2016; **18**: 1309-1321.
- Abuhelwa AY, Williams DB, Upton RN, Foster DJ. Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. *Eur J of Pharm and Biopharm.* 2017; **112**: 234-248.
- Alsenz J, Haenel E, Anedda A, Du Castel P, Cirelli G. Miniaturized INtrinsic DISSolution Screening (MINDISS) assay for preformulation. *Eur J Pharm Sci* 2016; **87**: 3–13.
- Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; **59(7)**: 546–567.
- Alsenz J, Meister E, Haenel E. Development of a partially automated solubility screening (PASS) assay for early drug development. *J Pharm Sci* 2007; **96(7)**: 1748–1762.
- Arnold YE, Imanidis G, Kuentz MT. Advancing in-vitro drug precipitation testing: new process monitoring tools and a kinetic nucleation and growth model. *J Pharm Pharmacol* 2011; **63(3)**: 333–341.
- Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **175(3)**: 880–5.
- Augustijns P, Brewster ME. Supersaturating drug delivery systems: Fast is not necessarily good enough. *J Pharma Sci*, 2012; **101(1)**: 7-9.
- Avdeef A, Tsinman K, Tsinman O, Sun N, Voloboy D. Miniaturization of Powder Dissolution Measurement and Estimation of Particle Size. *Chem Biodivers* 2009; **6(11)**: 1796–1811.

- Barmapsalou V-S *et al.* Biorelevant Gastrointestinal Transfer (BioGIT) System: Evaluation of Data Reproducibility and Its Usefulness in Estimating Indinavir and Fosamprenavir Concentrations in the Upper Intestinal Lumen after Oral Administration of Immediate Release Dosage Forms. Available at: <http://abstracts.aaps.org/Verify/AAPS2017/PosterSubmissions/T6019.pdf>. Accessed November 23, 2017.
- Bauer J, Spanton S, Henry R, Quick J, Dziki W, Porter W, Morris J. Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism *Pharm Res.* 2001; **18(6)**: 859-866.
- Bevernage J, Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. *Int J Pharm* 2013; **453(1)**: 25–35.
- Bevernage J, Hens B, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Augustijns P. Supersaturation in human gastric fluids. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; **81(1)**: 184–189.
- Bhattachar SN, Perkins EJ, Tan JS, Burns LJ. Effect of gastric pH on the pharmacokinetics of a bcs class II compound in dogs: Utilization of an artificial stomach and duodenum dissolution model and gastroplus™ simulations to predict absorption. *J Pharm Sci* 2011; **100(11)**: 4756–4765.
- Blanquet S, Zeidar E, Beyssac E, Meunier J-P, Denis S, Havenaar R, Alric M. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharm Res* 2004; **21(4)**: 585–91.
- Box KJ, Comer J, Taylor R, Karki S, Ruiz R, Price R, Fotaki N. Small-Scale Assays for Studying Dissolution of Pharmaceutical Cocrystals for Oral Administration. *AAPS PharmSciTech* 2016; **17(2)** : 245–51.
- Brouwers J., Brewster, M.E., Augustijns, P. Supersaturating drug delivery systems: the answer to solubility-limited oral bioavailability? *J. Pharm. Sci.* 2009; **98(8)**: 2549–2572.

- Carino SR, Sperry DC, Hawley M. Relative bioavailability estimation of carbamazepine crystal forms using an artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci* 2006; **95**(1): 116–125.
- Carino SR, Sperry DC, Hawley M. Relative bioavailability of three different solid forms of PNU-141659 as determined with the artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci* 2010; **99**(9): 3923–30.
- Chandran S, Gesenberg C, Levons J, Hubert M, Raghavan K. A high-throughput spectrophotometric approach for evaluation of precipitation resistance. *J Pharm Biomed Anal* 2011; **56**(4): 698–704.
- Chemburkar SR, Bauer J, Deming K, Spiwek H, Ketan P, Morris J, Henry R, Spanton S, Dziki W, Porter W, Quick J, Bauer P, Donaubaner J, Narayanan BA, Soldani M, Riley D, McFarland K. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Organic Process Res. Dev.* 2000; **4**(5): 413–417.
- Chokshi RJ, Shah NH, Sandhu HK, Malick AW, Zia H. Stabilization of low glass transition temperature indomethacin formulations: impact of polymer-type and its concentration. *J. Pharm. Sci.* 2008; **97**(6): 2286–2298.
- Cornely OA, Duarte RF, Haider S, Chandrasekar P, Helfgott D, Jiménez JL, Candoni A, Raad I, Laverdiere M, Langston A, Kartsonis N, Van Iersel M, Connelly N, Waskin H. Phase 3 pharmacokinetics and safety study of a posaconazole tablet formulation in patients at risk for invasive fungal disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; **71**(3): 718–726.
- Courtney R, Wexler D, Radwanski E, Lim J, Laughlim M. Effect of food on the relative bioavailability of two oral formulations of posaconazole in healthy adults. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2004; **57**(2): 218–222.
- Crowley MM, Zhang F, Repka MA, Thumma S, Sampada B, Upadhye SB, Battu SK, McGinity JW, Martin C. Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: part I. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2007; **33**(9): 909–926.

- Dahan A, Beig A, Lindley D, Miller JM. The solubility–permeability interplay and oral drug formulation design: Two heads are better than one. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; **101**: 99–107.
- Dai W-G, Dong LC, Li S, Pollock-Dove C, Chen J, Mansky P, Eichenbaum G. Parallel screening approach to identify solubility-enhancing formulations for improved bioavailability of a poorly water-soluble compound using milligram quantities of material. *Int J Pharm* 2007a; **336(1)**: 1–11.
- Dai W, Dong LC, Shi X, Nguyen J, Evans J, Xu Y, Creasey AA. Evaluation of drug precipitation of solubility-enhancing liquid formulations using milligram quantities of a new molecular entity (NME). *J Pharm Sci* 2007b; **96(11)**: 2957–2969.
- Dai W-G, Dong LC, Li S, Deng Z. Combination of Pluronic/Vitamin E TPGS as a potential inhibitor of drug precipitation. *Int J Pharm* 2008a; **355(1–2)**: 31–37.
- Dai W-G, Pollock-Dove C, Dong LC, Li S. Advanced screening assays to rapidly identify solubility-enhancing formulations: High-throughput, miniaturization and automation. *Adv Drug Deliv Rev* 2008b; **60(6)**: 657–672.
- Dai WG. In vitro methods to assess drug precipitation. *Int J Pharm* 2010; **393(1–2)**: 1–16.
- Ding X, Gueorguieva I, Wesley JA, Burns LJ, Coutant CA. Assessment of In Vivo Clinical Product Performance of a Weak Basic Drug by Integration of In Vitro Dissolution Tests and Physiologically Based Absorption Modeling. *AAPS J* 2015; **17(6)**: 1395–1406.
- Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm* 2006; **321(1–2)**: 1–11.
- Duarte RF, López-Jiménez J, Cornely OA, Laverdiere M, Helfgott D, Haider S, Chandrasekar P, Langston A, Perfect J, Ma L, van Iersel ML, Connelly N, Kartsonis N, Waskin H. Phase 1b study of new posaconazole tablet for prevention of invasive fungal infections in high-risk patients with neutropenia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; **58(10)**: 5758–5765.

- Frank KJ, Locher K, Zecevic DE, Fleth J, Wagner KG. In vivo predictive mini-scale dissolution for weak bases: Advantages of pH-shift in combination with an absorptive compartment. *Eur J Pharm Sci* 2014; **61**: 32–39.
- Gabriëls M, Plaizier-Vercammen J. Design of a dissolution system for the evaluation of the release rate characteristics of artemether and dihydroartemisinin from tablets. *Int J Pharm* 2004; **274(1–2)**: 245–260.
- Galia E, Nicolaides E, Hörter D, Löbenderg R, Reppas C, Dressman J. Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and II drugs. *Pharm. Res.* 1998; **15(5)**: 698-705.
- Gao P, Shi Y. Characterization of supersaturatable formulations for improved absorption of poorly soluble drugs. *AAPS J* 2012; **14(4)**: 703–13.
- Ghosh I, Snyder J, Vippagunta R, Alvine M, Vakil R, Tong W-Q, Vippagunta S. Comparison of HPMC based polymers performance as carriers for manufacture of solid dispersions using the melt extruder. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; **419(1-2)**: 12–19.
- Ginski MJ, Taneja R, Polli JE. Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system. *AAPS PharmSci* 1999; **1(2)**: E3.
- Gravestock T, Box K, Comer J, Frake E, Judge S, Ruiz R. The “GI dissolution” method: a low volume, in vitro apparatus for assessing the dissolution/precipitation behaviour of an active pharmaceutical ingredient under biorelevant conditions. *Anal Methods* 2011; **3(3)**: 560.
- Griffin BT, Kuentz M, Vertzoni M, Kostewicz ES, Fei Y, Faisal W, Stillhart C, O'Driscoll CM, Reppas C, Dressman JB. Comparison of in vitro tests at various levels of complexity for the prediction of in vivo performance of lipid-based formulations: Case studies with fenofibrate. *Eur J Pharm Biopharm* 2014; **86(3)**: 427–437.
- Grundya JS, Andersonb KE, Rogersb JA, Fosterb RT . Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. I. Description of a two-phase in vitro dissolution test. *J Control Release* 1997; **48(1)**: 1–8.

- Gu CH, Rao D, Gandhi RB, Hilden J, Raghavan K. Using a novel multicompartiment dissolution system to predict the effect of gastric pH on the oral absorption of weak bases with poor intrinsic solubility. *J Pharm Sci* 2005; **94(1)**: 199–208.
- Guzmán HR, Tawa M, Zhang Z, Ratanabanangkoon P, Shaw P, Gardener CR, Chen H, Moreau JP, Almarsson O, Remenar JF. Combined use of crystalline salt forms and precipitation inhibitors to improve oral absorption of celecoxib from solid oral formulations. *J. Pharm. Sci.* 2007; **96(10)**:2686–2702.
- Hancock BC, Shamblin SL, Zografi G. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm. Res.* 1995; **12(6)**:799–806.
- Hate SS, Reutzel-Edens SM, Taylor LS. Absorptive Dissolution Testing of Supersaturating Systems: Impact of Absorptive Sink Conditions on Solution Phase Behavior and Mass Transport. *Mol Pharm* 2017; **14(11)**: 4052–4063.
- Hens B, Brouwers J, Corsetti M, Augustijns P. Supersaturation and Precipitation of Posaconazole Upon Entry in the Upper Small Intestine in Humans. *J Pharm Sci* 2016a; **105(9)**: 2677–2684.
- Hens B, Corsetti M, Brouwers J, Augustijns P. Gastrointestinal and Systemic Monitoring of Posaconazole in Humans After Fasted and Fed State Administration of a Solid Dispersion. *J Pharm Sci* 2016b; **105(9)**: 2904–2912.
- Hens B, Brouwers J, Anneveld B, Corsetti M, Symillides M, Vertzoni M, Reppas C, Turner DB, Augustijns P. Gastrointestinal transfer: In vivo evaluation and implementation in in vitro and in silico predictive tools. *Eur J Pharm Sci* 2014; **63**: 233–242.
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; **96(3)**: 736–49.
- Huang J, Wigent RJ, Schwartz JB. Drug–polymer interaction and its significance on the physical stability of nifedipine amorphous dispersion in microparticles of an ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend. *J. Pharm. Sci.* 2008; **97(1)**: 251–262.

- Ilevbare GA, Liu H, Edgar KJ, Taylor LS. Understanding polymer properties important for crystal growth Inhibition—Impact of chemically diverse polymers on solution crystal growth of ritonavir. *Crystal Growth & Design* 2012; **12(6)**: 3133–3143.
- Jakubiak P, Wagner B, Grimm HP, Petrig-Schaffland J, Schuler F, Rubén Alvarez-Sánchez R. Development of a Unified Dissolution and Precipitation Model and Its Use for the Prediction of Oral Drug Absorption. *Mol Pharm* 2016; **13(2)**: 586–598.
- Jakubiak P, Wagner B, Grimm H-P, Petrig- Schaffland J, Schuler F, Alvarez-Sanchez R. Development of a Unified Dissolution and Precipitation Model and Its Use for the Prediction of Oral Drug Absorption. *Mol Pharm* 2016; **13(2)**: 586–598.
- Janssens S, Nagels S, Novoa de Armas H, D’Autry W, Van Schepdaae A, Van den Mooter G. Formulation and characterization of ternary solid dispersions made up of Itraconazole and two excipients: TPGS 1000 and PVPVA 64, that were selected based on a supersaturation screening study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; **69(1)**: 158–166.
- Jermain VS, Brough C, Williams III RO. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery- An update. *Inter. J. Pharm.* 2018; **535**: 379-392.
- Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B* 2015; **5(5)**: 442–453.
- Kambayashi A, Yasuji T, Dressman JB. Prediction of the precipitation profiles of weak base drugs in the small intestine using a simplified transfer (“dumping”) model coupled with in silico modeling and simulation approach. *Eur J Pharm Biopharm* 2016; **103**: 95–103.
- Kataoka M, Masaoka Y, Yamazaki Y, Sakane T, Sezaki H, Yamashita S. In vitro system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharm Res* 2003; **20(10)**: 1674–80.

- Kataoka M, Sugano K, da Costa Mathews C, Wong JW, Jones KL, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S. Application of dissolution/permeation system for evaluation of formulation effect on oral absorption of poorly water-soluble drugs in drug development. *Pharm Res* 2012; **29(6)**: 1485–1494.
- Kawakami K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; **64(6)**: 480–495.
- Klein S. The Mini Paddle Apparatus—a Useful Tool in the Early Developmental Stage? Experiences with Immediate-Release Dosage Forms. *Dissolution Technol* | Novemb 2006.
- Klein CE, Chiu Y-L, Awni W, Zhu T, Heuser R, Doan T, Breitenbach J, Morris J, Brun S, Hanna G. The tablet formulation of lopinavir/ritonavir provides similar bioavailability to the soft-gelatin capsule formulation with less pharmacokinetic variability and diminished food effect. *JAIDS J. of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2007; **44(4)**: 401–410.
- Klein S, Shah VP. A standardized mini paddle apparatus as an alternative to the standard paddle. *AAPS PharmSciTech* 2008; **9(4)**: 1179–84.
- Klein S, Buchanan NL, Buchanan CM. Miniaturized Transfer Models to Predict the Precipitation of Poorly Soluble Weak Bases upon Entry into the Small Intestine. *AAPS PharmSciTech* 2012; **13(4)**: 1230–1235.
- Kobayashi M, Sada N, Sugawara M, Iseki K, Miyazaki K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *Int J Pharm* 2001; **221(1–2)**: 87–94.
- Kokoletsi MX, Kaflaka S, Tsiaganis M. Anovel gradient HPLC method for simultaneous determination of ranitidine, methylparaben and propylenparaben in oral liquid pharmaceutical formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;**38(4)**:763-767.

- Kostewicz ES, Abrahamson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, Dickinson PA, Dressman J, Holm R, Klein S, Mann J, McAllister M, Minekus M, Muenster U, Müllertz A, Verwei M, Vertzoni M, Weitscheis W, Augustijns P. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci* 2014; **57(1)**: 342–366.
- Kostewicz ES, Wunderlich M, Brauns U, Becker R, Bock T, Dressman JB. Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. *J Pharm Pharmacol* 2004; **56(1)**: 43–51.
- Kourentas A, Vertzoni M, Stavrinoudakis N, Symillidis A, Brouwers J, Augustijns P, Reppas C, Symillides M. An in vitro biorelevant gastrointestinal transfer (BioGIT) system for forecasting concentrations in the fasted upper small intestine: Design, implementation, and evaluation. *Eur J Pharm Sci* 2016a; **82**: 106–114.
- Kourentas A, Vertzoni M, Symillides M, Goumas K, Gibbon R, Butler J, Reppas C. Effectiveness of supersaturation promoting excipients on albendazole concentrations in upper gastrointestinal lumen of fasted healthy adults. *Eur J Pharm Sci* 2016b; **91**: 11–19.
- Kourentas A, Vertzoni M, Khadra I, Symillides M, Clark H, Halbert G, Butler J, Reppas C. Evaluation of the Impact of Excipients and an Albendazole Salt on Albendazole Concentrations in Upper Small Intestine Using an In Vitro Biorelevant Gastrointestinal Transfer (BioGIT) System. *J Pharm Sci* 2016c; **105(9)**: 2896–2903.
- Kourentas A, Vertzoni M, Symillides M, Hens B, Brouwers J, Augustijns P, Reppas C. In vitro evaluation of the impact of gastrointestinal transfer on luminal performance of commercially available products of posaconazole and itraconazole using BioGIT. *Int J Pharm* 2016d; **515(1–2)**: 352–358.
- Kraft WK, Chang PS, van Iersel ML, Waskin H, Krishna G, Kersemaekers WM. Posaconazole tablet pharmacokinetics: lack of effect of concomitant medications altering gastric pH and gastric motility in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; **58(7)**: 4020–4025

- Krishna G, Moton A, Ma L, Medlock MM, McLeod J. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; **53**(3): 958–966.
- Kuentz M. Analytical technologies for real-time drug dissolution and precipitation testing on a small scale. *J Pharm Pharmacol* 2015; **67**(2): 143–159.
- Li P, Zhao L. Developing early formulations: Practice and perspective. *Int J Pharm* 2007; **341**(1-2): 1-19.
- Lindfors L, Forssen S, Westergren J, Olsson U. Nucleation and crystal growth in supersaturated solutions of a model drug. *J. Colloid Interface Sci.* 2008; **325**(2): 404–413.
- Litou C, Vertzoni M, Xu W, Kesisoglou F, Reppas C. The impact of reduced gastric acid secretion on dissolution of salts of weak bases in the fasted upper gastrointestinal lumen: Data in biorelevant media and in human aspirates. . *Eur J Pharm Biophar.* 2017; **115**: 94-101.
- Mansky P, Dai WG, Li S, Pollock-Dove C, Daehne K, Dong L, Eichenbaum G. Screening Method to Identify Preclinical Liquid and Semi-Solid Formulations for low Solubility Compounds: Miniaturization and Automation of Solvent Casting and Dissolution Testing. *J Pharm Sci* 2007; **96**(6): 1548–1563.
- Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; **93**: 173–182.
- Mathias NR, Xu Y, Patel D, Grass M, Caldwell B, Jager C, Mullin J, Hansen L, Crison J, Saari A, Gesenberg C, Morrison J, Vig B, Raghavan K. Assessing the risk of pH-dependent absorption for new molecular entities: A novel in vitro dissolution test, physicochemical analysis, and risk assessment strategy. *Mol Pharm* 2013; **10**(11): 4063–4073.
- Matsui K, Tsume Y, Amidon GE, Amidon GL. In Vitro Dissolution of Fluconazole and Dipyridamole in Gastrointestinal Simulator (GIS), Predicting in Vivo Dissolution and Drug-Drug Interaction Caused by Acid-Reducing Agents. *Mol Pharm* 2015; **12**(7): 2418–2428.

- Meng F, Gala U, Chauhan H. Classification of solid dispersions: correlation to (i) stability and solubility (ii) preparation and characterization techniques *Drug Dev Ind Pharm*, 2015; **41(9)**: 1520-5762.
- Miller DA, DiNunzio JC, Hughey JR, Williams OR, McGinity JW. KinetiSol: a new processing paradigm for amorphous solid dispersion systems. *Drug Dev. Delivery* 2012; **12(9)**.
- Miller DA, DiNunzio JC, Yang W, McGinity JW, Williams RO 3rd. Enhanced in vivo absorption of itraconazole via stabilization of supersaturation following acidic-to-neutral pH transition. *Drug Dev Ind Pharm* 2008; **34(8)**: 890-902.
- Mitra A, Fadda HM. Effect of surfactants, gastric emptying, and dosage form on supersaturation of dipyridamole in an in vitro model simulating the stomach and duodenum. *Mol Pharm* 2014; **11(8)**: 2835–2844.
- Moore JW, Flanner HH. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm. Tech.* 1996 ; **20**: 64-74.
- Morishita M, Peppas NA. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug Discov Today*. 2006; **11(19–20)**: 905–10.
- Motz SA, Schaefer UF, Balbach S, Eichinger T, Lehr CM. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **66(2)**: 286–295.
- Mudie DM, Murray K, Hoad CL, Pritchard SE, Garnett MC, Amidon GL, Gowland PA, Spiller RC, Amidon GE, Marciani L. Quantification of Gastrointestinal Liquid Volumes and Distribution Following a 240 mL Dose of Water in the Fasted State. *Mol Pharm* 2014; **11(9)**: 3039–3047.
- O' Dwyer PJ, Litou C, Box KJ, Dressman JB, Kostewicz ES, Kuentz M, Reppas C. In vitro methods to assess drug precipitation in the fasted small intestine-a PEARRL review. *J. Pharm. Pharmacol.* 2018; In press.
- Palmelund H, Madsen CM, Plum J, Müllertz A, Rades T. Studying the Propensity of compounds to Supersaturate: A Practical and Broadly Applicable Approach. *J Pharm Sci* 2016; **105(10)**: 3021–3029.

- Petruševska M, Urleb U, Peternel L. Evaluation of a High-Throughput Screening Method for the Detection of the Excipient-Mediated Precipitation Inhibition of Poorly Soluble Drugs. *Assay Drug Dev Technol* 2013a; **11(2)**: 117–129.
- Petruševska M, Urleb U, Peternel L. Evaluation of the light scattering and the turbidity microtiter plate-based methods for the detection of the excipient-mediated drug precipitation inhibition. *Eur J Pharm Biopharm* 2013b; **85(3,Part B)**: 1148–1156.
- Plum J, Madsen CM, Teleki A, Bevernage J, da Costa Mathews C, Karlsson EM, Carlert S, Holm R, Müller T, Matthews W, Sayers A, Ojala K, Tsinsman K, Lingamaneni R, Bergström CA, Rades T, Müllertz A. Investigation of the intra- and inter-laboratory reproducibility of a small scale standardized supersaturation and precipitation method. *Mol Pharm* 2017; **14(12)**: 4161-4169.
- Psachoulas D, Vertzoni M, Butler J, Busby D, Symillides M, Dressman J, Reppas C. An in vitro methodology for forecasting luminal concentrations and precipitation of highly permeable lipophilic weak bases in the fasted upper small intestine. *Pharm Res* 2012; **29(12)**: 3486–3498.
- Psachoulas D, Vertzoni M, Goumas K, Kalioras K, Beato S, Butler J, Reppas C. Precipitation in and supersaturation of contents of the upper small intestine after administration of two weak bases to fasted adults. *Pharm Res* 2011; **28(12)**: 3145–3158.
- Qian F, Huang J, Hussain MA. Drug–polymer solubility and miscibility: stability consideration and practical challenges in amorphous solid dispersion development. *J. Pharm. Sci.* 2010; **99(7)**: 2941–2947.
- Raghavan SL, Schuessel K, Davis A, Hadgraft J. Formation and stabilisation of triclosan colloidal suspensions using supersaturated systems. *Int. J. Pharm.* 2003; **261 (1–2)**: 153–158.
- Raghavan SL, Trividic A, Davis AF, Hadgraft J. Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers. *Int J Pharm.* 2001; **212(2)**: 213-221.
- Resigno A. Bioequivalence. *Pharm. Res.* 1992; **9(7)**: 925-928.

- Rubbens J, Brouwers J, Tack J, Augustijns P. Gastrointestinal dissolution, supersaturation and precipitation of the weak base indinavir in healthy volunteers. *Eur J Pharm Biopharm* 2016; **109**: 122–129.
- Ruff A, Fiolka T, Kostewicz ES. Prediction of Ketoconazole absorption using an updated in vitro transfer model coupled to physiologically based pharmacokinetic modelling. *Eur J Pharm Sci* 2017; **100**: 42–55.
- Schiller C, Fröhlich CP, Giessmann T, Siegmund W, Mönnikes H, Hosten N, Weitschies W. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; **22(10)**: 971–979.
- Selen A *et al.* Exploring Suitability and Feasibility of a Novel In Vitro Dissolution System. *AAPS Annual Meeting 2008; poster No. R6313*.
- Selen A, Rodriguez WJ, Doub WH, Buhse LF, Chikhale EG MH. Application of FloVibro™ Technology to Evaluate Dissolution of Furosemide and Danazol, in Simulated Media at Fed and Fasted Conditions. In: *AAPS Annual Meeting Washington, D.C., 2011*.
- Shi Y, Gao P, Gong Y, Ping H. Application of a biphasic test for characterization of in vitro drug release of immediate release formulations of celecoxib and its relevance to in vivo absorption. *Mol Pharm* 2010; **7(5)**: 1458–1465.
- Simonelli AP, Mehta SC, Higuchi WI. Inhibition of sulfathiazole crystal growth by pyrrolidone. *J Pharm Sci*. 1970; **59(5)**: 633–638.
- Sugawara M, Kadomura S, He X, Takekuma Y, Kohri N, Miyazaki K. The use of an in vitro dissolution and absorption system to evaluate oral absorption of two weak bases in pH-independent controlled-release formulations. *Eur J Pharm Sci* 2005; **26(1)**: 1–8.
- Sun DD, Lee PI. Evolution of supersaturation of amorphous pharmaceuticals: the effect of rate of supersaturation generation. *Mol. Pharm.* 2013; **10(11)**: 4330–4346.
- Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; **4(4)**: 395–411.

- Takeuchi S, Tsume Y, Amidon GE, Amidon GL. Evaluation of a Three Compartment In Vitro Gastrointestinal Simulator Dissolution Apparatus to Predict In Vivo Dissolution. *J Pharm Sci* 2014; **103(11)**: 3416–3422.
- Thu Hoa N, Kinget R. Design and Evaluation of Two-Phase Partition–Dissolution Method and Its Use in Evaluating Artemisinin Tablets. *J Pharm Sci* 1996; **85(10)**: 1060–1063.
- Tsinman K, Avdeef A, Tsinman O, Voloboy D. Powder Dissolution Method for Estimating Rotating Disk Intrinsic Dissolution Rates of Low Solubility Drugs. *Pharm Res* 2009; **26(9)**: 2093–2100.
- Tsinman K, Tsinman O. Dissolution-permeability Apparatus with Integrated In Situ Concentration Monitoring of both Donor and Receiver Compartments. AAPS Annual Meeting 2013; poster No. W5300. Available at: <http://abstracts.aaps.org/Verify/aaps2013/postersubmissions/W5300.pdf>. Accessed July 19, 2017.
- Tsume G, Amidon L, Takeuchi S. Dissolution effect of gastric and intestinal pH for a BCS class II drug, Pioglitazone: new in vitro dissolution system to predict in vivo dissolution. *J Bioequiv Availab*. 2013; **5**: 224-227.
- Tsume Y, Igawa N, Drelich AJ, Amidon GE, Amidon GL. The combination of GIS and biphasic to better predict in vivo dissolution of BCS class IIb drugs, ketoconazole and raloxifene. *J Pharm Sci* 2017; **107(1)**: 307-316.
- Tsume Y, Matsui K, Searls AL, Takeuchi S, Amidon GE, Sun D, Amidon GL. The impact of supersaturation level for oral absorption of BCS class IIb drugs, dipyrindamole and ketoconazole, using in vivo predictive dissolution system: Gastrointestinal Simulator (GIS). *Eur J Pharm Sci* 2017; **102**: 126–139.
- Tsume Y, Takeuchi S, Matsui K, Amidon GE, Amidon GL. In vitro dissolution methodology, mini-Gastrointestinal Simulator (mGIS), predicts better in vivo dissolution of a weak base drug, dasatinib. *Eur J Pharm Sci* 2015; **76**: 203–212.

- Van Den Abeele J, Schilderink R, Schneider F, Mols R, Minekus M, Weitschies W, Brouwers J, Tack J, Augustijns P. Gastrointestinal and Systemic Disposition of Diclofenac under Fasted and Fed State Conditions Supporting the Evaluation of *in vitro* Predictive Tools. *Mol Pharm* 2017; **14(12)**: 4220-4232.
- Vangani S, Li X, Zhou P, Del-Barrio M-A, Chiou R, Cauchon N, Gao P, Medina C, Jastin R. Dissolution of poorly water-soluble drugs in biphasic media using USP 4 and fiber optic system. *Clin Res Regul Aff* 2009; **26(1-2)**: 8-19.
- Vasanthavada M, Tong W-Q, Joshi Y, Kislalioglu MS. Phase behavior of amorphous molecular dispersions I: Determination of the degree and mechanism of solid solubility. *Pharm. Res.* 2004; **21(9)**: 1598-1606.
- Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today* 2007; **12(23)**: 1068-75.
- Vertzoni M, Symillides M, Iliadis A, Nicolaides E, Reppas C. Comparison of simulated cumulative drug versus time data sets with indices. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003; **56**: 421-428.
- Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the *in vivo* dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; **60(3)**: 413-417.
- Vertzoni M, Reppas C, Archontaki H. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of ketoconazole in canine plasma. *J. Chromatogr. B.* 2006; **839**: 62-67.
- Wagner C, Jantratid E, Kesisoglou F, Vertzoni M, Reppas C, B Dressman J. Predicting the oral absorption of a poorly soluble, poorly permeable weak base using biorelevant dissolution and transfer model tests coupled with a physiologically based pharmacokinetic model. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; **82(1)**: 127-138.

- Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, Chandrasekar P, Donowitz GR, Graybill R, Greene RE, Hachem R, Hadley S, Herbrecht R, Langston A, Louie A, Ribaud P, Segal BH, Stevens DA, Van Burik J-AH, White CS, Corcoran G, Gogate J, Krishna G, Pedicone L, Hardalo C, Perfect JR. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 2007; **44**(1): 2–12.
- Wang X, Michoel A, Van den Mooter G. Solid state characteristics of ternary solid dispersions composed of PVP VA64, Myrj 52 and itraconazole. *Int. J. Pharm.* 2005; **303**(1–2): 54–61.
- Watson H *et al.* Biphasic Dissolution Studies of Poorly Water Soluble Drugs, AAPS Annual Meeting 2016; poster No. 24W0130. Available at: <http://abstracts.aaps.org/Verify/AAPS2016/PosterSubmissions/24W0130.pdf>. Accessed July 19, 2017.
- Wiederhold NP. Pharmacokinetics and safety of posaconazole delayed-release tablets for invasive fungal infections. *Clin. Pharmacol., Adv. Appl.* 2016; **8**: 1–8.
- Yamashita S, Tanaka Y, Endoh Y, Taki Y, Sakane T, Nadai T, Sezaki H. Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer: implication for predicting in vivo drug absorption. *Pharm Res* 1997; **14**(4): 486–91.
- Yamashita T, Ozaki S, Kushida I. Solvent shift method for anti-precipitant screening of poorly soluble drugs using biorelevant medium and dimethyl sulfoxide. *Int J Pharm* 2011; **419**(1–2): 170–174.
- Zhu AZX, Ho MD, Gemski CK, Chuang BC, Liao M, Xia CQ. Utilizing In Vitro Dissolution-Permeation Chamber for the Quantitative Prediction of pH-Dependent Drug-Drug Interactions with Acid-Reducing Agents: a Comparison with Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *AAPS J* 2016; **18**(6): 1512–1523.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

*Μέθοδοι προσδιορισμού δραστικών συστατικών και χαρακτηριστικά
καμπυλών αναφοράς*

Π.1.1 Ρανιτιδίνη (RNT)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ρανιτιδίνης, εφαρμόστηκε μέθοδος ανάλυσης HPLC που βασίστηκε σε δημοσιευμένη μέθοδο (Kokoletsi et al., 2005) με τα παρακάτω χαρακτηριστικά :

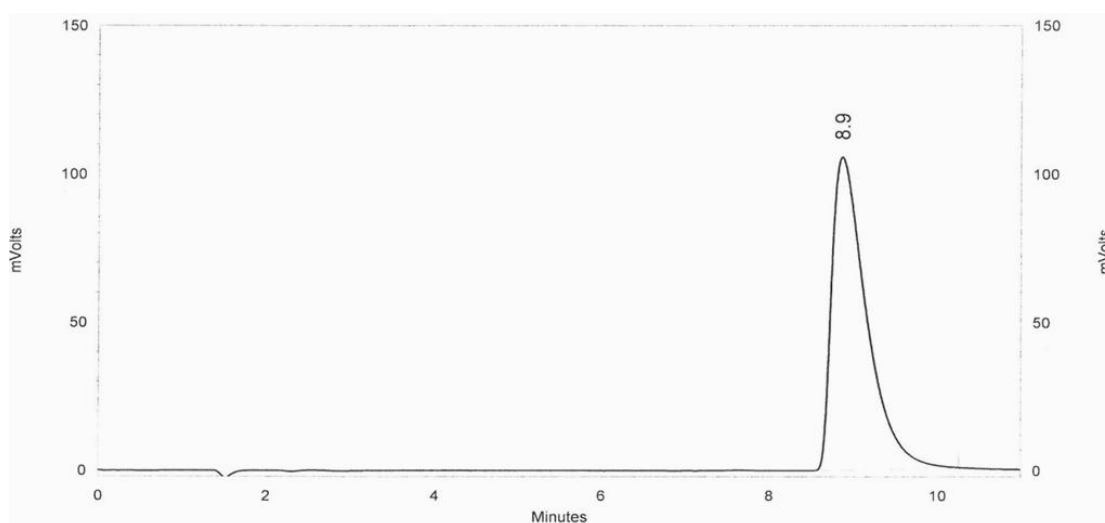
Στήλη:	Fortis C18 (150 x 3 mm, 5 μm)
Προστήλη:	BDS C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)
Ροή:	0,5 ml/min
Μήκος Κύματος:	230 nm
Όγκος ενιόμενου δείγματος:	50 μl
Θερμοκρασία:	Δωματίου
Κινητή Φάση:	Μυρμηκικό Αμμώνιο 10 mM (pH=4,7) : Ακετονιτρίλιο (90 : 10 v/v)
Διαλύτης Έκπλυσης:	Νερό : Ακετονιτρίλιο (90 : 10 v/v)
Χρόνος Έκλουσης:	≈ 9 min
Διάλυμα Παρακαταθήκης:	100 μg/ml (0,01 g RNT σε 100 ml νερό)

Για την παρασκευή καμπύλης αναφοράς ακολουθείται η εξής διαδικασία: παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης ρανιτιδίνης σε νερό (10 mg/ml) ζυγίζοντας και διαλύοντας 0,01 g ρανιτιδίνης σε 100 ml απιονισμένου νερού. Από το διάλυμα παρακαταθήκης, λαμβάνονται 10, 30, 50, 70, 100, 150, 200 μl και αναμιγνύονται με 990, 970, 950, 930, 910, 890, 870, 850, 830, 810, 790, 770, 750, 730, 710, 690, 670, 650, 630, 610, 590, 570, 550, 530, 510, 490, 470, 450, 430, 410, 390, 370, 350, 330, 310, 290, 270, 250, 230, 210, 190, 170, 150, 130, 110, 90, 70, 50, 30, 10 μl κινητής φάσης, αντίστοιχα, ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 1, 3, 5, 7, 10, 15 και 20 μg/ml, αντίστοιχα. Τα δείγματα μετά από ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης ενίονται σε συσκευή HPLC.

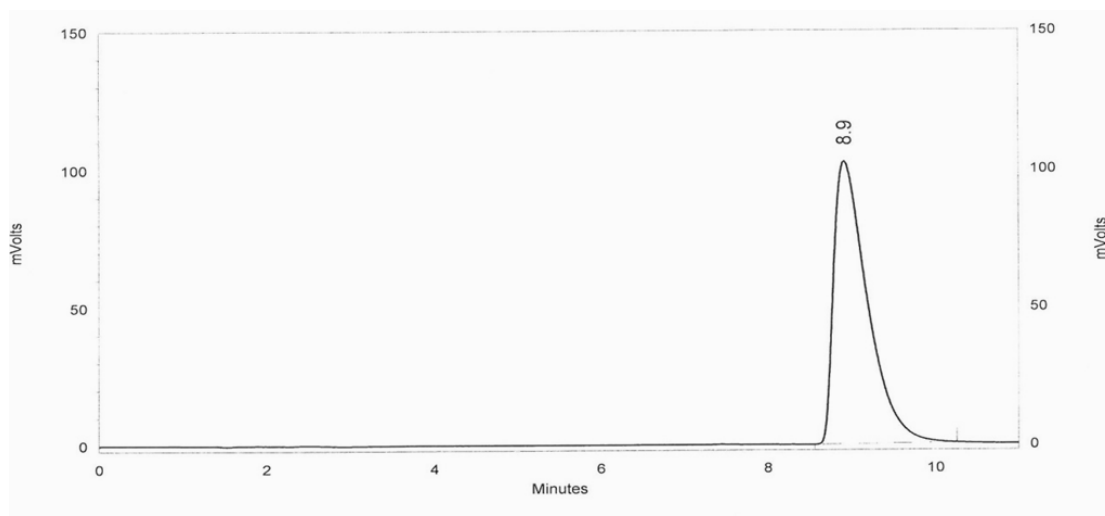
Τα χαρακτηριστικά των ευθειών παλινδρόμησης που λαμβάνονται για την ρανιτιδίνη παρουσιάζονται στον Πίνακα Π.1.1. Στα Σχήματα Π.1.1 και Π.1.2 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα προτύπου διαλύματος ρανιτιδίνης σε κινητή φάση και δείγματος από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα 25 λεπτά κατά την εκτέλεση ενός πειράματος με τη διάταξη BioGIT, αντίστοιχα.

Πίνακας Π.1.1: Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς ρανιτιδίνης.

Καμπύλη Αναφοράς	Εύρος Συγκεντρώσεων (μg/ml)	Σημεία	Κλίση ±SE	Τομή ±SE	R ²
#1	1-10	5	318473±1341	11663±8133	0,99995
#2	1-20	7	300652±1520	41218±16337	0,9998
#3	1-20	7	294904±4608	12770±49538	0,998



Σχήμα Π.1.1: Ενδεικτικό χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος ρανιτιδίνης συγκέντρωσης 10 μg/ml, σε κινητή φάση.



Σχήμα Π.1.2: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ρανιτιδίνης στο διήθημα δείγματος που συλλέχθηκε στα 25 min από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης BioGIT.

Π.1.2 Κετοκοναζόλη (KCZ)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κετοκοναζόλης, εφαρμόστηκε μέθοδος ανάλυσης HPLC βασισμένη σε δημοσιευμένη αναλυτική μέθοδο (Vertzoni et al., 2006) με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

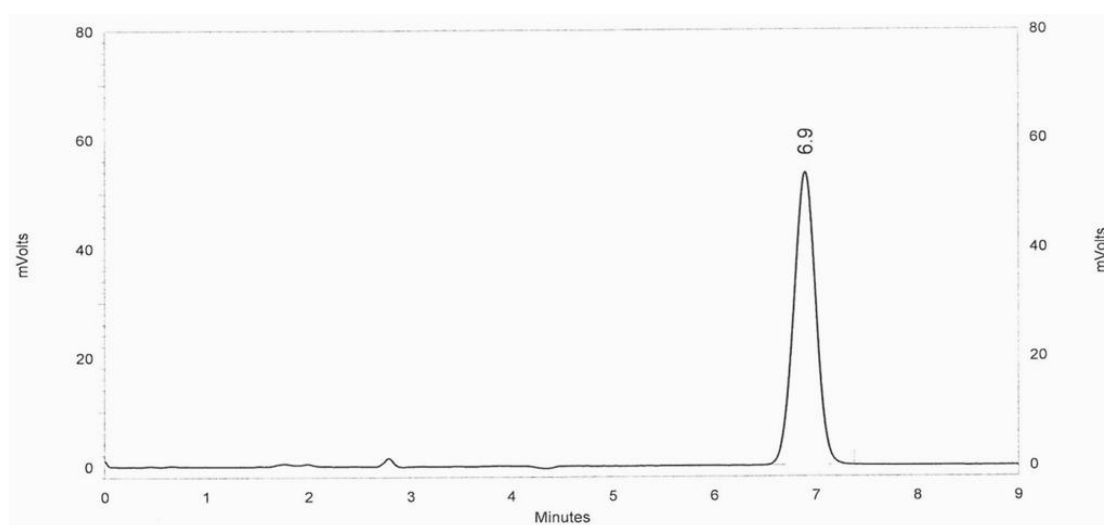
Στήλη:	BDS C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)
Ροή:	1 ml/min
Μήκος Κύματος:	240 nm
Όγκος ενιόμενου δείγματος:	50 μl
Θερμοκρασία:	Δωματίου
Κινητή Φάση:	Μεθανόλη : Νερό : Διαιθυλαμίνη (74 : 26 : 0,1 v/v/v)
Διαλύτης Εκπλύσης:	Μεθανόλη : Νερό (74 : 26 v/v)
Χρόνος Έκλουσης:	≈ 7 min
Διάλυμα Παρακαταθήκης:	100 μg/ml (0,01 g KCZ σε 100 ml Μεθανόλη)

Για την παρασκευή της καμπύλης αναφοράς ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και για την ρανιτιδίνη.

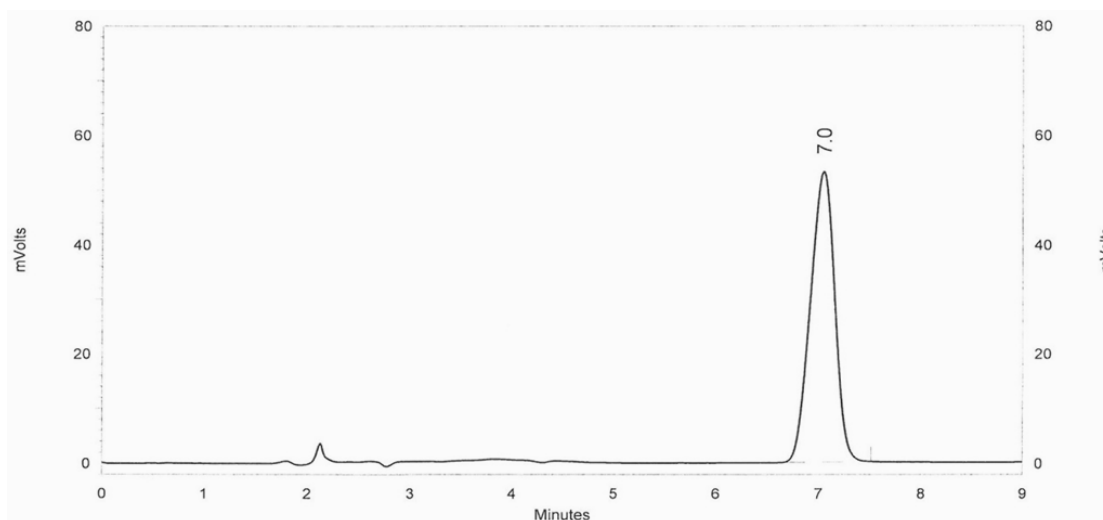
Τα χαρακτηριστικά των ευθειών παλινδρόμησης που λαμβάνονται για την κετοκοναζόλη παρουσιάζονται στον Πίνακα Π.1.2. Στα Σχήματα Π.1.3 και Π.1.4 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα προτύπου διαλύματος κετοκοναζόλης σε κινητή φάση και από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης KCZ στο διήθημα δείγματος από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα 25, αντίστοιχα.

Πίνακας Π.1.2: Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς κετοκοναζόλης.

Καμπύλη Αναφοράς	Εύρος Συγκεντρώσεων (μg/ml)	Σημεία	Κλίση ±SE	Τομή ±SE	R ²
#1	1-20	8	83308±559	-18032±6098	0,9997
#2	1-20	7	83890±403	-23841±4332	0,9998
#3	1-20	7	85645±1249	-20368±13429	0,998



Σχήμα Π.1.3: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος κετοκοναζόλης συγκέντρωσης 10 μg/ml σε κινητή φάση.



Σχήμα Π.1.4: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κετοконаζόλης στο διήθημα δείγματος που συλλέχθηκε στα 25 min από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Π.1.3 Πιογλιταζόνη (PIO)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πιογλιταζόνης εφαρμόστηκε μέθοδος ανάλυσης HPLC βασισμένη σε δημοσιευμένη αναλυτική μέθοδο (Litou et al., 2017) με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

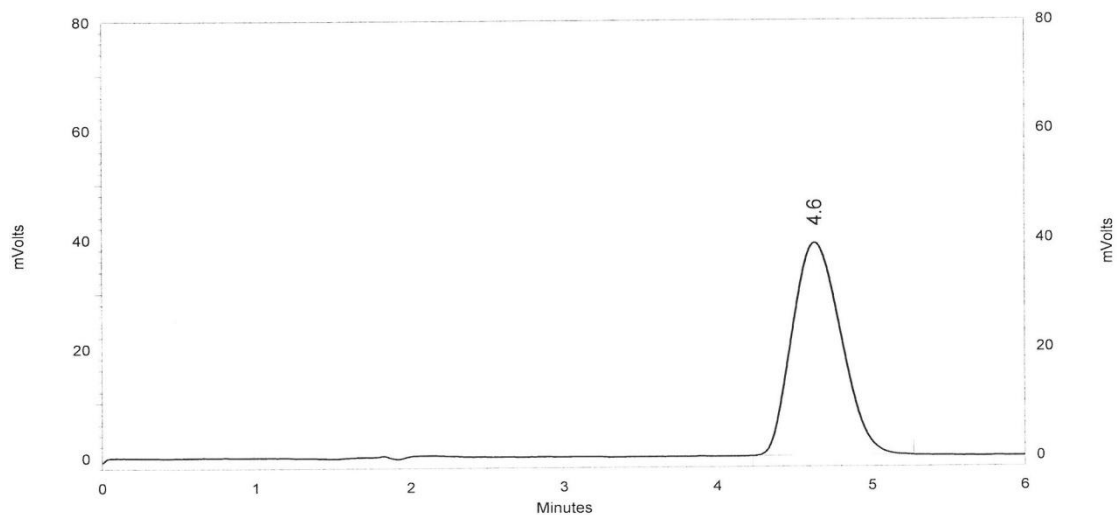
Στήλη:	Fortis C18 (150 x 3 mm, 5 μm)
Προστήλη:	BDS Hypersil C18 (10 x 4,6 mm, 5 μm)
Ροή:	0,5 ml/min
Μήκος Κύματος:	280 nm
Όγκος ενιόμενου δείγματος:	50 μl
Θερμοκρασία:	Δωματίου
Κινητή Φάση:	Ρυθμιστικό Διάλυμα (NaH ₂ PO ₄ 10 mM, pH 2,5) : Ακετονιτρίλιο (70 : 30 v/v)
Διαλύτης Εκπλύσης:	Νερό : Ακετονιτρίλιο (70 : 30 v/v)
Χρόνος Έκλουσης:	≈ 5 min
Διάλυμα Παρακαταθήκης:	100 μg/ml (0,01102 g PIO-HCl σε 100 ml Ακετονιτρίλιο)

Για την παρασκευή της καμπύλης αναφοράς ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και για την ρανιτιδίνη. Για τις συγκεντρώσεις 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 και 0,7 µg/ml, από το διάλυμα συγκέντρωσης 10 µg/ml, μεταφέρονται ποσότητες δείγματος 10, 20, 30, 50 και 70 µl σε καινούρια γυάλινα φιαλίδια, όπου αναμιγνύονται με 90, 80, 70, 50 και 30 µl κινητής φάσης, αντίστοιχα. Ακολουθεί ανάμιξη σε συσκευή περιδίνησης και ένεση στην HPLC.

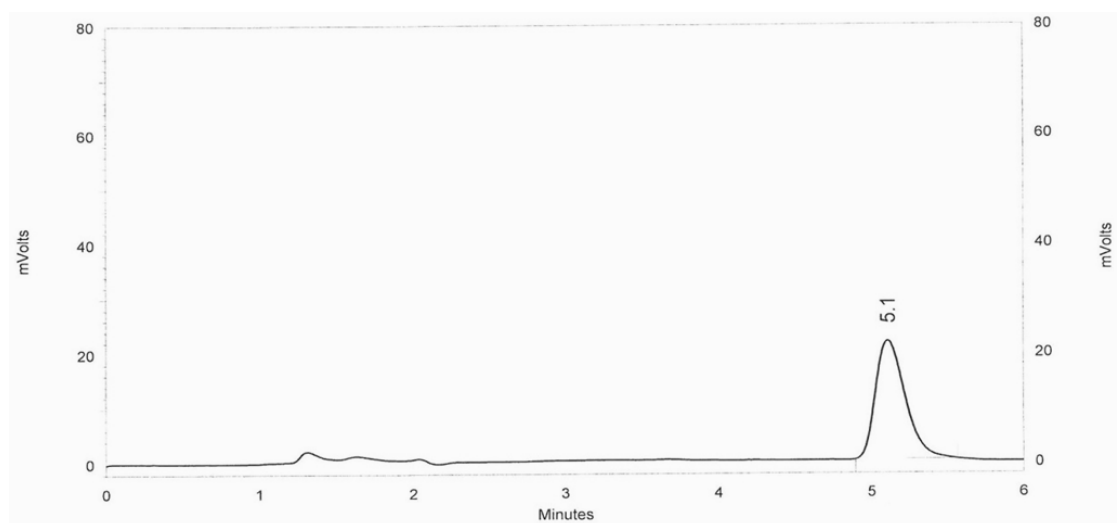
Τα χαρακτηριστικά των ευθειών παλινδρόμησης που λαμβάνονται για την πιογλιταζόνη παρουσιάζονται στον Πίνακα Π.1.3. Στα Σχήματα Π.1.5, Π.1.6 και Π.1.7 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα προτύπου διαλύματος πιογλιταζόνης σε κινητή φάση και από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ΡΙΟ στο διήθημα δείγματος από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα 25 λεπτά κατά την εκτέλεση πειράματος με τη διάταξη “20-30 min one-step”, με επιπέδου προσομοίωσης II FaSSIF ή HIF_{fasted} στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, αντίστοιχα.

Πίνακας Π.1.3: Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς πιογλιταζόνης.

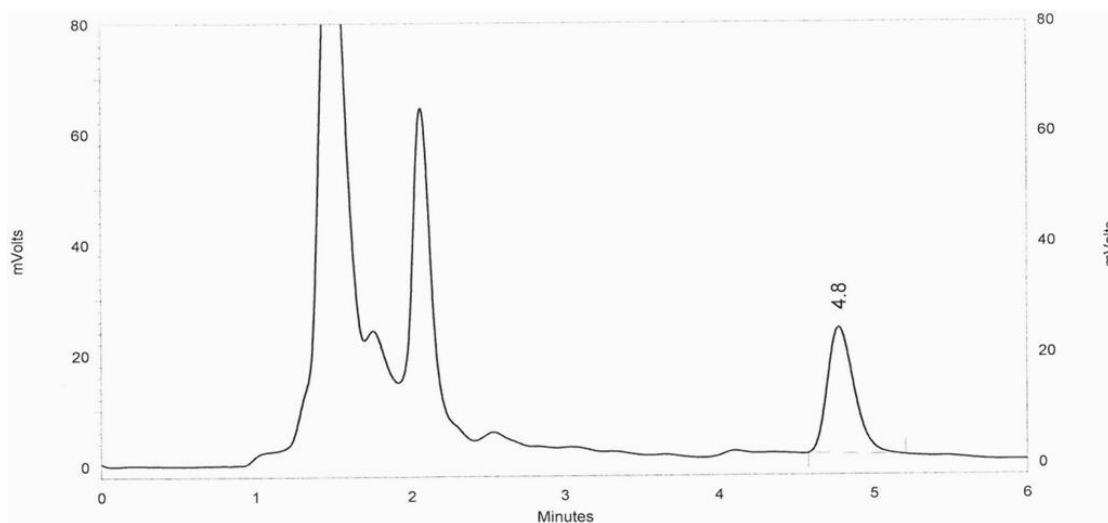
Καμπύλη Αναφοράς	Εύρος Συγκεντρώσεων (µg/ml)	Σημεία	Κλίση ±SE	Τομή ±SE	R ²
#1	1-10	5	88266±655	-492±3971	0,9998
#2	1-10	5	87869±606	6100±3679	0,9998
#3	0,1-10	10	86421±484	-1651±2080	0,9997



Σχήμα Π.1.5: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος πιογλιταζόνης συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/ml}$ σε κινητή φάση.



Σχήμα Π.1.6: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πιογλιταζόνης στο διήθημα δείγματος που συλλέχθηκε στα 25 min από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετείται FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II.



Σχήμα Π.1.7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πιογλιταζόνης στο διήθημα δείγματος που συλλέχθηκε στα 25 min από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετείται HIF_{fasted}.

Π.1.4 Δραστική ουσία Α

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της δραστικής ουσία Α, εφαρμόστηκε μέθοδος ανάλυσης HPLC (δεδομένα αρχείου Merck) με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

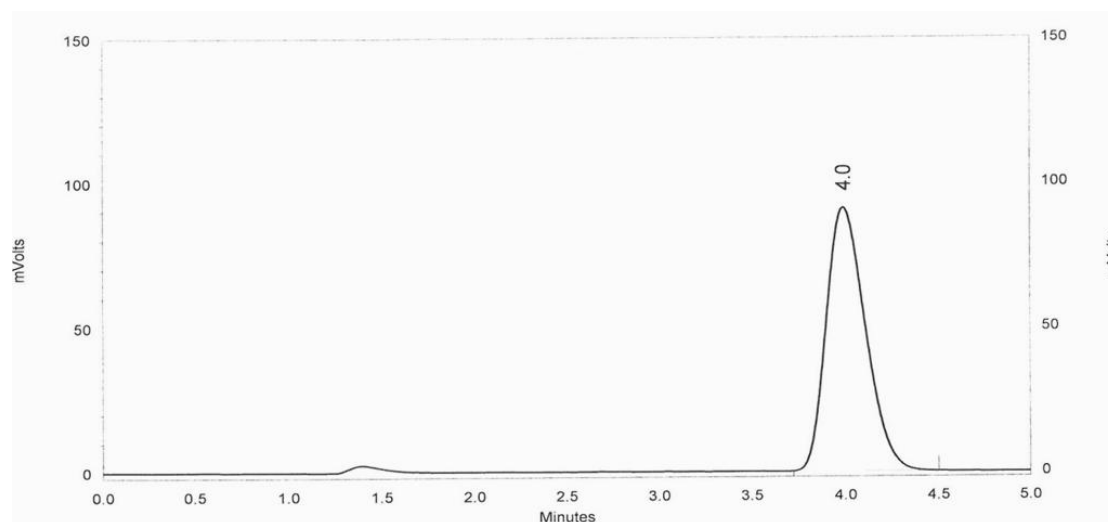
Στήλη:	Fortis C18 (150 x 3 mm, 5 μm)
Ροή:	0,5 ml/min
Μήκος Κύματος:	240 nm
Όγκος ενιόμενου δείγματος:	50 μl
Θερμοκρασία:	Δωματίου
Κινητή Φάση:	Νερό: Ακετονιτρίλιο: Φωσφορικό οξύ (50 : 50 : 0,05 v/v/v)
Διαλύτης Εκπλύσης:	Νερό : Ακετονιτρίλιο (50 : 50 v/v)
Χρόνος Έκλουσης:	≈ 4 min
Διάλυμα Παρακαταθήκης:	100 μg/ml (0,01 g δραστική ουσία Α σε 100 ml Ακετονιτρίλιο)

Ακολουθείται η ίδια μεθοδολογία στην παρασκευή και τον χειρισμό των δειγμάτων, όπως και στην ρανιτιδίνη.

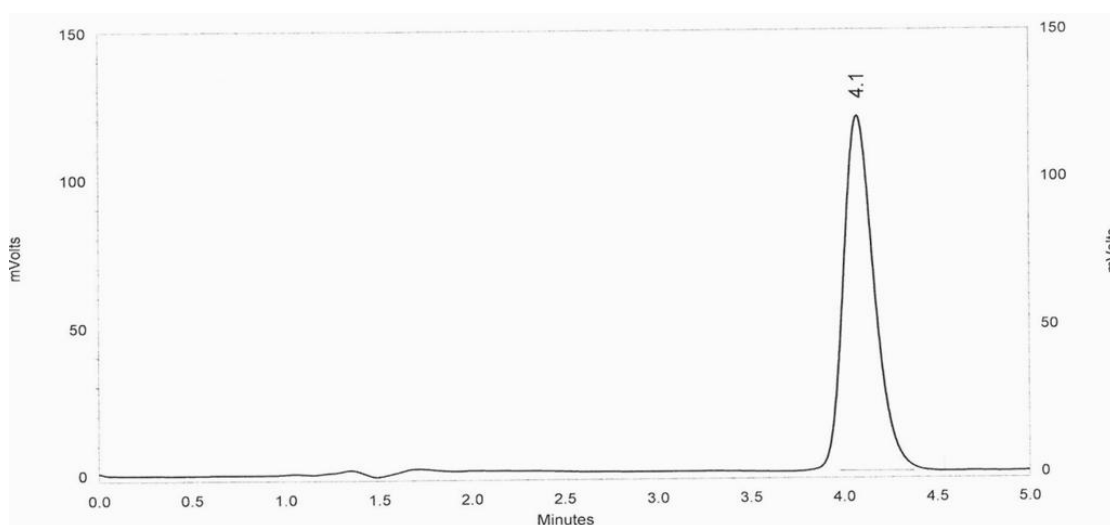
Τα χαρακτηριστικά των ευθειών παλινδρόμησης που λαμβάνονται για την δραστική ουσία Α παρουσιάζονται στον Πίνακα Π.1.4. Στα Σχήματα Π.1.8, Π.1.9 και Π.1.10 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος δραστικής ουσίας Α σε κινητή φάση και από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης δραστικής ουσίας Α στο διήθημα δείγματος από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα 25 λεπτά κατά την εκτέλεση πειράματος με τη διάταξη “20-30 min one-step”, με επιπέδου προσομοίωσης II FaSSIF ή HIF_{fasted} στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, αντίστοιχα.

Πίνακας Π.1.4: Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς δραστικής ουσίας Α.

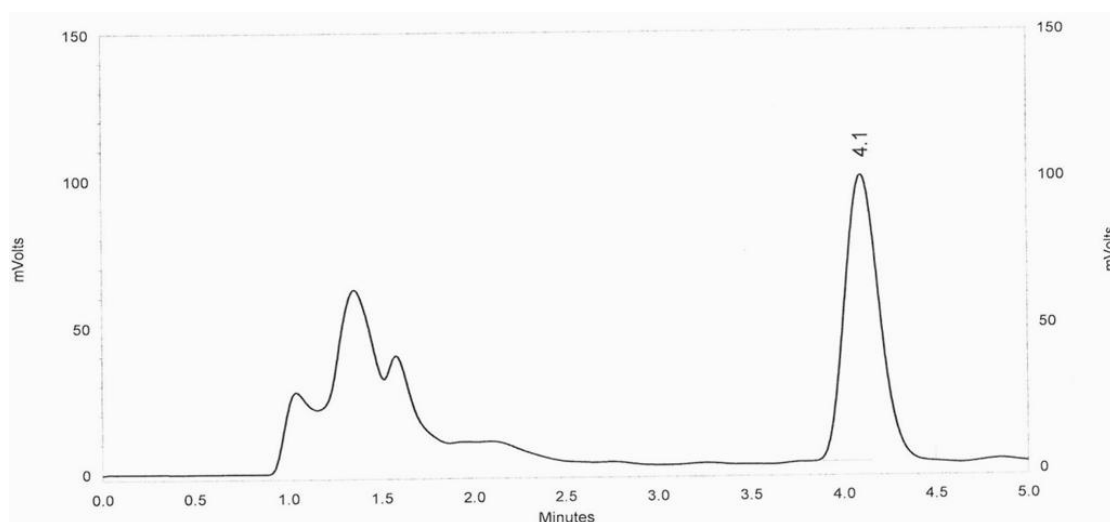
Καμπύλη Αναφοράς	Εύρος Συγκεντρώσεων (μg/ml)	Σημεία	Κλίση ±SE	Τομή ±SE	R ²
#1	1-20	8	134272±546	3846±5963	0,9999
#2	1-20	8	135634±902	17468±9846	0,9997
#3	1-10	5	136952±1571	8027±9530	0,9996



Σχήμα Π.1.8: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος δραστικής ουσίας Α συγκέντρωσης 10 μg/ml σε κινητή φάση.



Σχήμα Π.1.9: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης δραστικής ουσίας A στο διήθημα δείγματος που συλλέχθηκε στα 25 min από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα διάταξης “20-30 min one-step” όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετείται FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II.



Σχήμα Π.1.10: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης δραστικής ουσίας A στο διήθημα δείγματος που συλλέχθηκε στα 25 min από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα διάταξης “20-30 min one-step” όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετείται HIF_{fasted}.

Π.1.5 Δραστική ουσία Β

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ουσίας δραστικής ουσίας Β, εφαρμόστηκε μέθοδος ανάλυσης HPLC (δεδομένα αρχείου Merck) με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

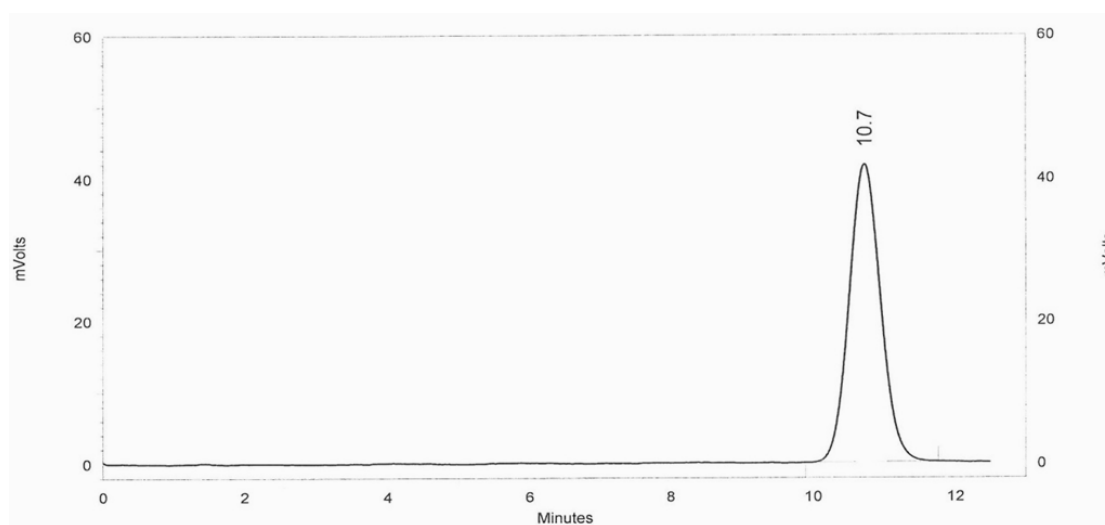
Στήλη:	Fortis C18 (150 × 3 mm, 5 μm)
Προστήλη:	BDS C18 (10 × 4,6 mm, 5 μm)
Ροή:	0,5 ml/min
Μήκος Κύματος:	340 nm
Όγκος ενιόμενου δείγματος:	50 μl
Θερμοκρασία:	Δωματίου
Κινητή Φάση:	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (pH 7,5) : Ακετονιτρίλιο (50 : 50 v/v)
Διαλύτης Εκπλύσης:	Νερό : Ακετονιτρίλιο (50 : 50 v/v)
Χρόνος Έκλουσης:	≈ 10 min
Διάλυμα Παρακαταθήκης:	100 μg/ml (0,01 g δραστική ουσία Β σε 100 ml Ακετονιτρίλιο)

Ακολουθείται η ίδια μεθοδολογία στην παρασκευή και τον χειρισμό των δειγμάτων, όπως και στην πιογλιταζόνη.

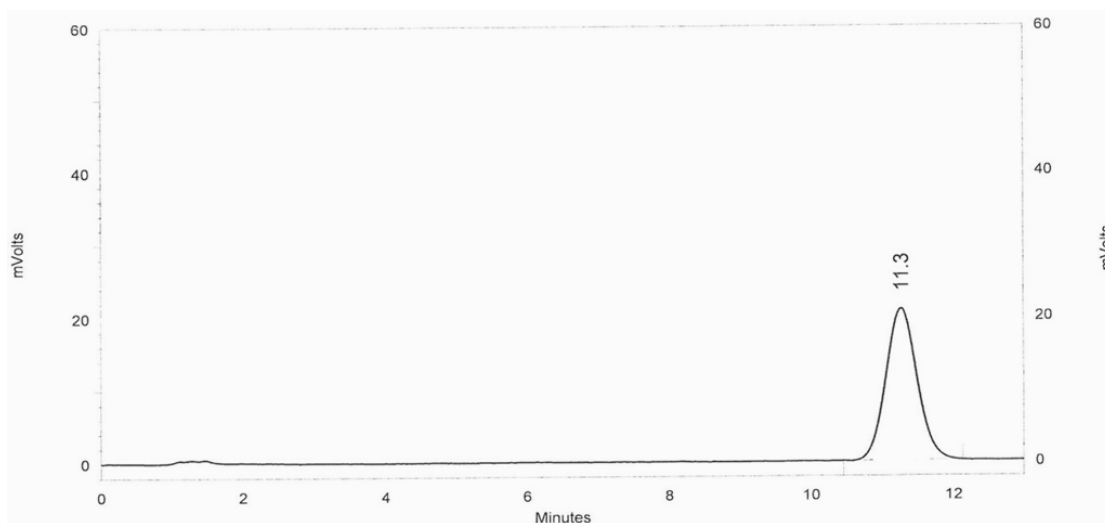
Τα χαρακτηριστικά των ευθειών παλινδρόμησης που λαμβάνονται για την δραστική ουσία Β παρουσιάζονται στον Πίνακα Π.1.5. Στα Σχήματα Π.1.11, Π.1.12 και Π.1.13 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα προτύπου διαλύματος δραστικής ουσίας Β σε κινητή φάση και από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης δραστικής ουσίας Β στο διήθημα δείγματος από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα 25 λεπτά κατά την εκτέλεση πειράματος με τη διάταξη “20-30 min one-step”, με επιπέδου προσομοίωσης II FaSSIF ή HIF_{fasted} στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, αντίστοιχα.

Πίνακας Π.1.5: Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς δραστικής ουσίας Β.

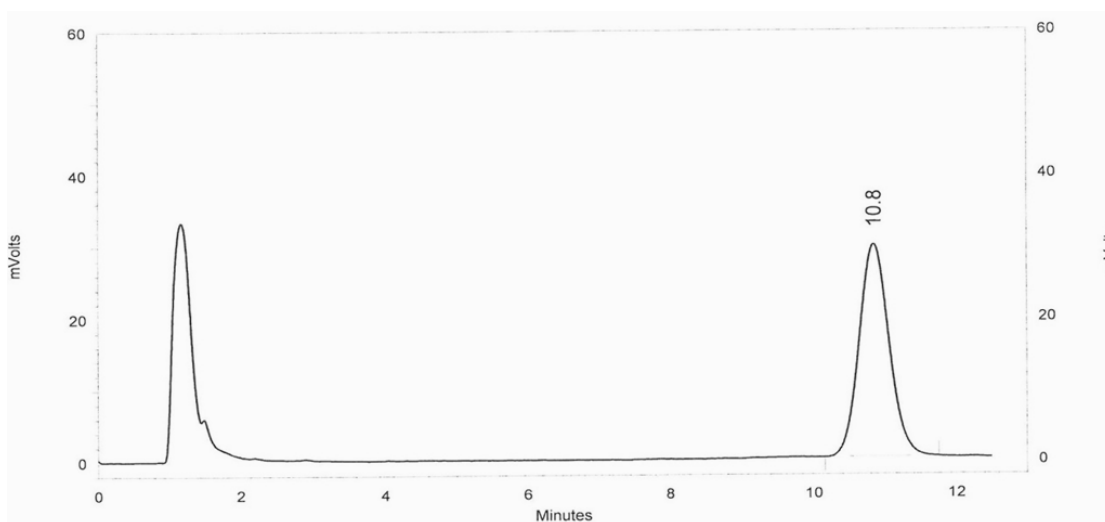
Καμπύλη Αναφοράς	Εύρος Συγκεντρώσεων (μg/ml)	Σημεία	Κλίση ±SE	Τομή ±SE	R ²
#1	0,7-12	7	242180±637	6064±4361	0,99997
#2	0,3-15	10	245678±619	5501±4610	0,99995
#3	0,3-10	8	246039±1326	2634±6372	0,9998



Σχήμα Π.1.11: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος δραστικής ουσίας Β συγκέντρωσης 5 μg/ml σε κινητή φάση.



Σχήμα Π.1.12: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης δραστικής ουσίας Β στο διήθημα δείγματος που συλλέχθηκε στα 25 min από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετείται FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II.



Σχήμα Π.1.13: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης δραστικής ουσίας Β στο διήθημα δείγματος που συλλέχθηκε στα 25 min από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετείται HIF_{fasted}.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

*Αντίγραφα αδειών κλινικής μελέτης, δήλωσης συγκατάθεσης και
ερωτηματολογίου εθελοντών*

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΚΟΡΓΙΑΛΕΝΕΙΟ – ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ ΕΕΣ
ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΔΙΟΙΚ. ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ
Αριθ. Πρωτ. 20679

**ΑΠΟΣΠΑΣΜΑ ΠΡΑΚΤΙΚΟΥ
ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ 17^{ης} ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗΣ**

Στην Αθήνα, σήμερα 19 Σεπτεμβρίου 2016 ημέρα Δευτέρα και ώρα 13.00μμ, συνήλθε σε συνεδρίαση, το Διοικητικό Συμβούλιο υπό την προεδρία της Προέδρου του Δ.Σ. κ. Βελέντζα – Ζουρούδη Ευαγγελίας για την λήψη απόφασης επί των θεμάτων της ημερήσιας διάταξης. Στη συνεδρίαση εκλήθησαν όλα τα μέλη και παρευρέθησαν, ο Διευθυντής Διοικητικής Υπηρεσίας κ. Ανδρουτσόπουλος Δημήτριος ως αναπληρωματικό μέλος του Αντιπροέδρου, ο Διοικητής και μέλος κ. Ιωάννης Πετρόχειλος, τα μέλη, Τιμπισράνης Μιχαήλ, Αντώνιος Κουλουβράκης, Μυλωνά Σοφία και Δημητρώπουλος Λεωνίδας.

Το μέλος Εμμανουήλ Κωττάκης δήλωσε κώλυμα και απουσίαζε. Δεν κατέστη δυνατή η επικοινωνία με το αναπληρωματικό μέλος την κα. Τσιακατούρα Χαρίκλεια.

Στη συνεδρίαση συμμετείχε η Γραμματέας του Δ.Σ κ. Παναγιώτα Καρακώστα

Θέμα 15^ο «Έγκριση διεξαγωγής μελέτης»

Το Διοικητικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου έχοντας υπόψη :

1. Την υπ' αριθμ. 14001/ 4-7-2016 αίτηση του Διευθυντή και Επιστημονικά Υπεύθυνου του Γαστρεντερολογικού Τμήματος κ. Γκούμα Κωνσταντίνου, για την έγκριση μελέτης με τίτλο « Συλλογή και μερικός χαρακτηρισμός περιεχομένων του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου υγιών ενηλίκων κατά τη διαπτεπτική περίοδο», η οποία θα διεξαχθεί στο Γαστρεντερολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ και υπό την επίβλεψη του Δ/ντού κ. Γκούμα..
2. Την υπ' αριθμ. 15149/13-7-2016 εισήγηση του Επιστημονικού Συμβουλίου

ΑΠΟΦΑΣΙΖΕΙ

1. Την έγκριση διεξαγωγής της μελέτης με τίτλο «Συλλογή και μερικός χαρακτηρισμός περιεχομένων του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου υγιών ενηλίκων κατά τη διαπτεπτική περίοδο»

2. Με ευθύνη της Προέδρου του Διοικητικού Συμβουλίου και του Επιστημονικά Υπευθύνου της Μελέτης, δεν θα προκύψει οικονομική επιβάρυνση του Νοσοκομείου κατά την υλοποίησή της.

ΕΝΕΡΓΕΙΑ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ
ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ
ΓΡ.ΠΡΟΕΔΡΟΥ
ΓΡ.ΔΙΟΙΚΗΤΗ
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΥΠΟΔ/ΝΣΗ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟΥ
ΓΡΑΜ. ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ



ΑΚΡΙΒΕΣ ΑΠΟΣΠΑΣΜΑ
ΑΘΗΝΑ 4 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2016
Η ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΤΟΥ Δ.Σ.
ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΚΑΡΑΚΩΣΤΑ

ΘΕΜΑ: Έγκριση διεξαγωγής μελέτης.

Το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου αφού έλαβε υπόψη την αίτηση του Διευθυντή, Επιστημονικά Υπεύθυνου του Γαστρεντερολογικού τμήματος κ. Γκούμα Κων/νου, με αριθ. Πρωτ. 14001/ 4-7-2016 για έγκριση μελέτης με τίτλο « Συλλογή και μερικός χαρακτηρισμός περιεχομένων και ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου υγιών ενηλίκων κατά τη διαπνευτική περίοδο»

Εισηγείται

Θετικά για την έγκριση μελέτης. Δεν υπάρχει οικονομική επιβάρυνση για το Νοσοκομείο μας.

**Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ
ΤΟΥ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ
ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΚΟΗΚΙΑΣ
ΚΩΣΤΑΣ ΛΕΝΕΙΩ ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ Ε.Ε.Σ.
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ
ΠΡΟΕΔΡΟΣ: Α. ΚΑΤΣΙΒΑΣ
Α. ΚΑΤΣΙΒΑΣ**

Κοινοποιήσεις
- Γρ. Διοικητή

Ονοματεπώνυμο: _____

Τηλέφωνο: _____

Ημερομηνία: _____

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Είστε διαθέσιμος δύο διαφορετικά Σάββατα ή Κυριακές από το Δεκέμβριο 2016 μέχρι τον Απρίλιο 2018 (8:00 π.μ -3:00 μ.μ); Ναι Όχι
Αν ναι, ποια Σάββατα/Κυριακές δε θα μπορούσατε να προσέλθετε;

2. Έχετε ασφάλιση; Ναι Όχι Που; _____
3. Καπνίζετε; Ναι Όχι Πόσα τσιγάρα την ημέρα;
Είστε σε θέση να απέχετε από το κάπνισμα τουλάχιστον για 3 τριήμερα; Ναι Όχι
4. Είστε σε θέση να απέχετε από την κατανάλωση αλκοόλ τουλάχιστον για 3 τριήμερα; Ναι Όχι
5. Ποια είναι η ηλικία σας, ποιο είναι το βάρος και ποιο το ύψος σας;
6. Έχετε ή είχατε στο παρελθόν κάποιο γαστρεντερολογικό πρόβλημα; Ναι Όχι

7. Έχετε ή είχατε στο παρελθόν κάποιο χρόνιο πρόβλημα υγείας; (π.χ. από το καρδιαγγειακό σύστημα, το θυρεοειδή, το πάγκρεας ή το ήπαρ;) Πως το αντιμετωπίσατε; Ναι Όχι

8. Τι φάρμακα έχετε καταναλώσει τις τελευταίες 30 μέρες;

9. Παίρνετε συνταγογραφούμενα φάρμακα; Ναι Όχι
-
10. Παίρνετε μη συνταγογραφούμενα φάρμακα; Ναι Όχι
- Ποια; Πόσο συχνά;
-
11. Παίρνετε αντιόξινα; Ναι Όχι
-
12. Είστε σε θέση να απέχετε από την κατανάλωση συνταγογραφούμενων και μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων τουλάχιστον για 3 τριήμερα; Ναι Όχι
13. Χρησιμοποιείτε αντισυλληπτικά χάπια; (αν ναι, πριν πόσο καιρό αρχίσατε τη χρήση αντισυλληπτικών). Δ.Ε
-
14. Είστε έγκυος ή θηλάζετε; Ναι Όχι Δ.Ε
15. Είστε αποκλειστικά χορτοφάγος; Ναι Όχι
16. Έχετε πάρει πρόσφατα μέρος σε κάποια άλλη μελέτη που περιλαμβάνει φάρμακα; Ναι Όχι
17. Έχετε κανονικές εντερικές συνήθειες (δυσκοιλιότητα, διάρροια); Ναι Όχι
18. Κάνετε εύκολα /συχνά εμετό; Ναι Όχι
19. Αντιμετωπίζετε δυσκολίες στην κατάποση; Ναι Όχι
20. Είστε αλλεργικός σε κάτι; _____
21. Έχετε υποβληθεί σε κάποια σημαντική χειρουργική επέμβαση;
-

Ενημέρωση

- Αναλύσεις αίματος (test ηπατίτιδας και AIDS).
- Test εγκυμοσύνης.

Παρατηρήσεις



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Συλλογή και μερικός χαρακτηρισμός περιεχομένων
του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου υγιών ενηλίκων
κατά τη διαπεπτική περίοδο**

Πληροφορίες για τη μελέτη
και
δήλωση συγκατάθεσης εθελοντή για συμμετοχή στη μελέτη

Ερευνητές

Κωνσταντίνος Γκούμας, PHD,
Γαστρεντερολογικό Τμήμα, Κοργιαλένιο – Μπενάκειο Νοσοκομείο Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού

Χρήστος Ρέππας, PHD, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μαρία Βερτζώνη, PHD, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Καλείστε να συμμετάσχετε σε μια μελέτη που περιλαμβάνει τη συλλογή δειγμάτων από το ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου.

Πριν αποφασίσετε για τη συμμετοχή σας, είναι σημαντικό να κατανοήσετε το σκοπό, καθώς και τι περιλαμβάνει η μελέτη. Ρωτήστε μας, εάν δεν καταλαβαίνετε κάτι ή αν επιθυμείτε περισσότερες πληροφορίες. Αφιερώστε χρόνο πριν αποφασίσετε, για το εάν θέλετε να συμμετάσχετε στη διαδικασία επιλογής εθελοντών και, στην περίπτωση που επιλεγείτε, να συμμετάσχετε στη μελέτη.

Ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης;

Τα αναρροφηθέντα δείγματα από τα περιεχόμενα του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου (το σημείο αυτό βρίσκεται αμέσως μετά το στομάχι) θα χρησιμοποιηθούν στο εργαστήριο (Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΕΚΠΑ) με στόχο την καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας απορρόφησης φαρμάκων που είναι ασθενείς βάσεις καθώς και φαρμακευτικών προϊόντων νεώτερου τύπου που κυκλοφορούν ήδη (π.χ. καψάκια μαλακής ζελατίνης). Οι ασθενείς βάσεις μπορεί να είναι φάρμακα που ανήκουν σε όλες τις θεραπευτικές κατηγορίες. Ο όρος «ασθενής βάση» σχετίζεται με τις χημικές ιδιότητες και όχι με τη θεραπευτική δράση. Τα νεώτερου τύπου φαρμακευτικά προϊόντα μπορεί να περιέχουν φάρμακα που ανήκουν σε όλες τις θεραπευτικές κατηγορίες. Η καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας της απορρόφησης σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει στην επιτάχυνση της διαδικασίας ανάπτυξης φαρμάκων με παρόμοιες ιδιότητες. Παρόλο που το φύλο δεν έχει σημασία σε αυτόν τον τύπο έρευνας, για πρακτικούς λόγους μόνο άντρες θα συμμετέχουν σε αυτήν την μελέτη.

Τα δείγματα που θα συλλεχθούν δε θα χρησιμοποιηθούν για οποιοδήποτε γενετική έρευνα και δε θα δημιουργηθεί τράπεζα σχετικών δειγμάτων (biobank).

Γιατί έχω επιλεγεί;

Για τη μελέτη αυτή έχει γίνει δημόσια πρόσκληση εκδήλωσης ενδιαφέροντος. Έχετε ανταποκριθεί εθελοντικά στη σχετική πρόσκληση. Μετά από συνέντευξη με τους

ερευνητές, επιβεβαιώσαμε τη καλή γενική κατάσταση της υγείας. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήσαμε αναλύσεις αίματος για να αξιολογήσουμε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του αίματος, ηλεκτρολύτες και λιπίδια καθώς και παρουσία αντισωμάτων ηπατίτιδας και HIV. Με βάση τα παραπάνω αποφασίστηκε από τον κλινικό υπεύθυνο της μελέτης ότι έχετε όλες τις προϋποθέσεις για να συμμετέχετε ως εθελοντής στη μελέτη. Δεν υπάρχει κανένας άλλος λόγος ο οποίος ελήφθη υπόψη για να σας κάνουμε δεκτό/ή στη μελέτη, ως εθελοντή. Ακριβώς η ίδια διαδικασία θα ακολουθηθεί για την επιλογή όλων των εθελοντών στην παρούσα μελέτη (συνολικά δώδεκα αναρροφήσεις).

Κριτήρια επιλογής

Ο ενδιαφερόμενος θα συμπεριληφθεί ως εθελοντής στην κλινική μελέτη, εάν όλα τα παρακάτω (όπου εφαρμόζονται) ισχύουν:

- i. Ο ενδιαφερόμενος θέλει να συμμετάσχει στη μελέτη και αυτό επιβεβαιώνεται με υπογραφή του σχετικού εγγράφου συγκατάθεσης για εθελοντική συμμετοχή στη μελέτη.
- ii. Ο ενδιαφερόμενος είναι ηλικίας 18-50 ετών και το σωματικό βάρος δεν αποκλίνει περισσότερο από 20% του ιδανικού (σύμφωνα με του Πίνακες Metropolitan).
- iii. Μετά από κλινική εξέταση και αιματολογικές εξετάσεις (για αξιολόγηση ηλεκτρολυτών, λειτουργίας ήπατος και νεφρών, μορφολογικά χαρακτηριστικά του αίματος, επίπεδα λιπιδίων, παρουσία ηπατίτιδας και HIV) ο/η ενδιαφερόμενος(η) κρίνεται υγιής.
- iv. Ο ενδιαφερόμενος μπορεί να απέχει από κάπνισμα, κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, και λήψη μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων τουλάχιστον τρεις (3) μέρες πριν από κάθε μέρα πειραματισμού και κατά τη διάρκεια της παραμονής στο Νοσοκομείο.
- v. Με βάση τη γνώμη του Δρ. Γκούμα, ο ενδιαφερόμενος είναι ικανός και θέλει να συμμορφωθεί με όλες τις διαδικασίες που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της κλινικής μελέτης.

Κριτήρια αποκλεισμού

Ο ενδιαφερόμενος δεν θα συμπεριληφθεί ως εθελοντής στην κλινική μελέτη, εάν ο,τιδήποτε από τα παρακάτω ισχύει:

- i. Παρουσία σημαντικού χρόνιου ή παροδικού προβλήματος υγείας που απαιτεί τη λήψη συνταγογραφούμενου φαρμάκου. Η σημασία του προβλήματος θα αποφασισθεί από το Δρ. Γκούμα
- ii. Ιστορικό ασθένειας του γαστρεντερικού συστήματος, όπως υψηλή διημερήσια μεταβλητότητα στην κινητικότητα του εντέρου, παροδικό αίσθημα καύσου στην περιοχή του στομάχου, έλκος (ενεργό ή μη) σε οποιαδήποτε περιοχή του γαστρεντερικού βλεννογόνου.
- iii. Συμμετοχή σε άλλη κλινική μελέτη (που περιλαμβάνει ή δεν περιλαμβάνει τη λήψη κάποιου δραστικού συστατικού) λιγότερο από 30 μέρες πριν την έναρξη της παρούσας κλινικής μελέτης.
- iv. Χρήση φαρμάκου που μπορεί να επηρεάσει τη γαστρεντερική λειτουργία (αντιόξινα, αναστολείς αντλίας πρωτονίων, αναστολείς των H₂ υποδοχέων, υπακτικά, καθαρτικά) λιγότερο από 30 ημέρες από την έναρξη της παρούσας μελέτης.
- v. Πρόσφατο ιστορικό δυσκολίας στην κατάποση
- vi. Σημαντική ασθένεια ή δυσλειτουργία η οποία, κατά την άποψη του Δρ. Γκούμα, εάν ο ενδιαφερόμενος συμμετάσχει στη μελέτη είναι πιθανό να θέσει περαιτέρω κίνδυνο την υγεία του ενδιαφερόμενου, να επηρεάσει τα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης ή να επηρεάσει αυτήν την ίδια συμμετοχή του στη μελέτη (π.χ στένωση ρινικού διαφράγματος).

Είμαι υποχρεωμένος να λάβω μέρος;

Στη μελέτη θα λάβετε μέρος εθελοντικά. Εσείς θα αποφασίσετε τελικά για τη συμμετοχή σας στη μελέτη. Είναι σημαντικό, κάθε υποψήφιος εθελοντής, πριν αποφασίσει για τη συμμετοχή του να κατανοήσει πλήρως το γιατί γίνεται η μελέτη και το τι περιλαμβάνει. Κάθε υποψήφιος εθελοντής ενθαρρύνεται να ρωτήσει

ο,τιδήποτε παραμένει ασαφές και να ζητήσει πρόσθετες πληροφορίες. Κάθε υποψήφιος εθελοντής ενθαρρύνεται να έχει όσο χρόνο θέλει πριν αποφασίσει για τη επιθυμία του να συμμετάσχει στη μελέτη. Εάν τελικά αποφασίσετε θετικά, θα κληθείτε να συνυπογράψετε το παρόν κείμενο. Εάν συνυπογράψετε το παρόν κείμενο μπορείτε να αποχωρήσετε από τη μελέτη οποιαδήποτε στιγμή χωρίς να αναφέρετε το λόγο. Εάν συνυπογράψετε το παρόν κείμενο, οι ερευνητές έχουν το δικαίωμα να τερματίσουν πρόωρα της συμμετοχής σας στη μελέτη, για κάποιον από τους παρακάτω λόγους:

- Ακαταλληλότητα εθελοντή, που μπορεί να διαπιστωθεί κατά τη διάρκεια της μελέτης
- Σημαντική απόκλιση από (μη συμμόρφωση με) το πρωτόκολλο και τις απαιτήσεις της μελέτης
- Εκδήλωση παρενέργειας που υποχρεώνει σε διακοπή της συμμετοχής στη μελέτη
- Εκδήλωση ασθένειας που απαιτεί υποχρεώνει σε διακοπή της μελέτης

Τι θα μου συμβεί εάν λάβω μέρος ως εθελοντής;

Κατά τη διάρκεια μιας επίσκεψης ο συμμετέχων θα παραμείνει στο νοσοκομείο περίπου 2.5 h. Κατά τη διάρκεια της επίσκεψης, θα τοποθετηθεί ένας ρινο-γαστρο-εντερικός ελαστικός σωλήνας υπό ακτινοσκόπηση και θα σας χορηγηθεί ένα ποτήρι νερό (240 ml) νερού στο άντρο του στομάχου και θα ακολουθήσουν δειγματοληψίες από τα περιεχόμενα του πάνω μέρους του λεπτού εντέρου.

Λεπτομέρειες για την επίσκεψη

Το τι θα συμβεί πριν, κατά τη διάρκεια και μετά από μια επίσκεψή σας περιγράφεται αναλυτικά πιο κάτω:

Μέρα -1:

8:00μμ Ο Εθελοντής αρχίζει αποχή από φαγητό (νερό ad libitum)

Μέρα πειραματισμού:

8:00πμ Ο εθελοντής αφικνείται στο γαστρεντερολογικό τμήμα του ΝΕΕΣ και γίνεται σύντομη εξέταση από το Δρ. Γκούμα και τη Δρ. Βερτζώνη για

πιστοποίηση της υγείας του και συμμόρφωση με το πρωτόκολλο, αντίστοιχα.

- 8:30-9:00πμ Ο Εθελοντής διασωληνώνεται με ένα διπλότοιχο ρινο-γαστρο-εντερικό ελαστικό σωλήνα υπό ακτινοσκοπικό έλεγχο. Επιχειρείται να αναρροφηθεί τυφλό δείγμα από τα περιεχόμενα του στομάχου και του λεπτού εντέρου. Ο εθελοντής ηρεμεί για περίπου 5 min.
- 9:00πμ 240 ml μη ανθρακούχου νερού χορηγούνται μέσω του σωλήνα στο στόμαχο με τη βοήθεια συρίγγων των 60-ml (ca.). Το νερό είναι θερμοκρασίας δωματίου και η χορήγηση ολοκληρώνεται εντός 2 min.
- 9:00-10:30πμ Αναρροφούνται δείγματα από τον ανώτερο εντερικό αυλό με τη βοήθεια 10-ml ca. συρίγγων.
- 10:30πμ Ο εθελοντής υποβάλλεται σε ακτινοσκόπηση για να πιστοποιηθεί ότι ο ρινο-γαστρο-εντερικός σωλήνας βρίσκεται στη θέση που είχε αρχικά τοποθετηθεί και στη συνέχεια αφαιρείται από τον γαστρεντερικό αυλό. Ο εθελοντής στη συνέχεια είναι ελεύθερος να αποχωρήσει από το νοσοκομείο

Γενικές πληροφορίες που σχετίζονται με όλες τις επισκέψεις στο νοσοκομείο

Η τοποθέτηση και η παραμονή του ρινο-γαστρο-δωδεκαδακτυλικού σωλήνα στο γαστρεντερικό αυλό για περίπου 1 ώρα δεν προκαλεί πόνο αλλά δημιουργεί ένα αίσθημα δυσφορίας. Ανάλογα με την ευαισθησία του κάθε εθελοντή, ίσως ψεκάστεί ο φάρυγγας με τοπικό αναισθητικό 1-2 φορές κατά τη διάρκεια της μιας ώρας. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού θα κάθεστε σε ημι-ύπτια θέση και μπορείτε να ακούτε μουσική.

Και ο γαστρεντερολόγος (κλινικός υπεύθυνος της μελέτης) και ο ακτινολόγος έχουν μακροχρόνια εμπειρία σε σχετικές τεχνικές εισαγωγής ρινο-γαστρο-εντερικού σωλήνα και μέχρι σήμερα δεν έχουν υπάρξει απρόβλεπτα περιστατικά. Στην απίθανη περίπτωση εμφάνισης παρενέργειας κατά τη διάρκεια του πειραματισμού θα σας

προσφερθούν πρώτες βοήθειες και θεραπεία στο νοσοκομείο. Δεν πρόκειται να επιβαρυνθείτε οικονομικά για αυτές τις υπηρεσίες.

Θα λάβετε αμοιβή 200 ευρώ, μετά από την ολοκλήρωση μιας επίσκεψης. Μπορείτε να συμμετέχετε με δυο επισκέψεις στην παρούσα κλινική μελέτη. Η σχετική αμοιβή θα δοθεί από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών και υπόκειται σε φόρο.

Σε περίπτωση που ένας εθελοντής δεν ολοκληρώσει την επίσκεψή του για λόγους που δεν είναι υπεύθυνος ο ίδιος, θα λάβει την αμοιβή. Σε περίπτωση που ένας εθελοντής δεν ολοκληρώσει την επίσκεψή του για λόγους που είναι υπεύθυνος ο ίδιος δεν θα λάβει αμοιβή.

Ποια είναι τα πιθανά οφέλη από τη συμμετοχή μου στη μελέτη?

Δεν πρόκειται να έχετε κάποιος προσωπικό όφελος από τη συμμετοχή σας ως εθελοντή στη μελέτη. Τα αποτελέσματα της μελέτης και η χρήση των δειγμάτων και των αποτελεσμάτων των μετρήσεων (σύμφωνα με όσα περιγράφονται στο παρόν κείμενο) ανήκουν αποκλειστικά στους ερευνητές (ΕΚΠΑ και Merck & Co., Inc). Είναι πιθανό να προκύψουν αιτήσεις για έκδοση διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας στα οποία οι εθελοντές δεν θα έχουν καμία συμμετοχή. Κανένας από τους εθελοντές δεν θα έχει κάποιο δικαίωμα ή κάποιο εμπορικό κέρδος που σχετίζεται με την πνευματική υπηρεσία που αναφέρεται πιο πάνω.

Θα είναι η συμμετοχή μου στη μελέτη εμπιστευτική?

Όλες οι προσωπικές πληροφορίες κάθε εθελοντή θεωρούνται αυστηρά προσωπικά δεδομένα. Ως προσωπικές πληροφορίες θεωρούνται τόσο οι πληροφορίες που συλλέγονται κατά τη διάρκεια της συνέντευξης όσο και τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Δημοσίευση προσωπικών πληροφοριών είναι πιθανό να γίνει αλλά με τρόπο που να μην είναι δυνατή η αποκάλυψη της ταυτότητας του εθελοντή. Η

μοναδική περίπτωση που είναι πιθανή η ταυτοποίηση ενός εθελοντή είναι όταν κάτι τέτοιο απαιτηθεί από νόμο και με την προϋπόθεση ότι η Ελληνική Ανεξάρτητη Αρχή Προσωπικών Δεδομένων συμφωνήσει.

Αν αποφασίσετε να λάβετε μέρος στη μελέτη, ο γιατρός και η ερευνητική του ομάδα θα χρησιμοποιήσουν τα δεδομένα όπως περιγράφονται στη δήλωση συγκατάθεσης.. Τα δεδομένα αυτά περιλαμβάνουν το όνομα σας, το τηλέφωνό σας, το ιατρικό ιστορικό, την ημερομηνία γέννησης, πληροφορίες από τις βιοχημικές εξετάσεις (συμπεριλαμβανομένων των εξετάσεων ηπατίτιδας και HIV) και πληροφορίες σχετικές με την επίσκεψή σας.

Κάθε πληροφορία που μεταφέρεται εκτός νοσοκομείου δε θα περιέχει το όνομα εθελοντή. Για την προστασία των προσωπικών σας δεδομένων δείγματα και αποτελέσματα και ιατρικά δεδομένα που μεταφέρονται εκτός νοσοκομείου θα επισημαίνονται με αριθμό εθελοντή και όχι με όνομα εθελοντή.

Η Επιτροπή Ηθικής και όλοι όσοι εργάζονται για και με τον Χορηγό αυτής της μελέτης θα εξασφαλίσουν την εμπιστευτικότητα των δεδομένων. Επιπλέον, τα δεδομένα που θα συλλεχθούν θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από άλλους ερευνητές με τρόπο που να μην είναι δυνατή η αποκάλυψη της ταυτότητας του εθελοντή. Πληροφορίες που θα μπορούν να σας ταυτοποιήσουν με τα δεδομένα δεν θα συμπεριληφθούν.

Ο Χορηγός αυτής της έρευνας και όσοι εργάζονται με ή για αυτόν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα δεδομένα που θα του σταλούν για να τα συγκρίνει με δεδομένα που έχουν συλλεγεί σε παρόμοιες μελέτες, για να αναπτύξει νέες τεχνικές και για άλλες δραστηριότητες (όπως τμήματα ανάπτυξης και κανονιστικών θεμάτων). Για τις παραπάνω περιπτώσεις, ο Χορηγός μπορεί να δώσει τα δεδομένα με όσους εμπλέκονται σε αυτά τα τμήματα εφόσον συμφωνήσουν να τα χρησιμοποιήσουν όπως περιγράφεται στην παρούσα Δήλωση Συγκατάθεσης. Ο Χορηγός αυτής της έρευνας και όσοι εργάζονται με ή για αυτόν δεν θα μεταφέρουν τα δεδομένα από τη χώρα σας σε άλλες χώρες όπου δεν υπάρχει σχετική νομοθεσία.

Για το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα για σκοπό διαφορετικό από αυτόν που αναγράφεται στην παρούσα δήλωση συγκατάθεσης, όσοι εργάζονται για και με τον Χορηγό εφαρμόζουν τις κατάλληλες διαδικασίες για να διασφαλίσουν ότι η πιθανότητα να συμβεί αυτό είναι εξαιρετικά μικρή.

Όλα τα δεδομένα που θα συγκεντρωθούν μετά από την ανάλυση των δειγμάτων μπορούν να δοθούν στον εθελοντή μετά από έγγραφη σχετική επιθυμία του εθελοντή. Στο σχετικό έγγραφο πρέπει να περιλαμβάνεται η φράση: "Αντιλαμβάνομαι ότι η αποκάλυψη των δεδομένων σε τρίτο μέρος απαγορεύεται, εκτός εάν πρόκειται για ιατρικούς λόγους. Δημοσίευση των δεδομένων αυτών μπορεί να γίνει μόνο από τους ερευνητές".

Τι θα συμβεί στα αποτελέσματα της μελέτης;

Στόχος είναι τα δείγματα που θα αναρροφηθούν από εσάς να ενωθούν με αυτά όλων των εθελοντών που θα λάβουν μέρος στη μελέτη (συνολικά 12 αναρροφήσεις) για να χρησιμοποιηθούν σε μία συσκευή μελέτης της διάλυσης φαρμακευτικών προϊόντων. Τα αποτελέσματα θα δημοσιευθούν στην ανοικτή βιβλιογραφία και θα γίνουν διαθέσιμα στην ιατρική και επιστημονική κοινότητα. Κανένας από τους συμμετέχοντες εθελοντές δεν θα ταυτοποιηθεί στις σχετικές δημοσιεύσεις. Τα αποτελέσματα δε θα ανακοινωθούν στους εθελοντές εκτός εάν κάτι τέτοιο ζητηθεί γραπτώς από κάποιον εθελοντή ή κατά τη διάρκεια μιας φάσης της μελέτης ή μετά από τη λήψη όλων των δεδομένων ο Δρ Γκούμας κρίνει ότι πρέπει να ενημερωθεί σχετικά κάποιος εθελοντής. Ο χρόνος της δημοσίευσης των αποτελεσμάτων δεν είναι γνωστός με βεβαιότητα πριν την ολοκλήρωση της μελέτης.

Ποιος οργανώνει τη μελέτη;

Η μελέτη αποτελεί συνεργασία του NEEΣ και του ΕΚΠΑ και αποτελεί μέρος ερευνητικής συνεργασίας του ΕΚΠΑ και της Merck Sharp & Dohme Corp. (Merck & Co., Inc, Η.Π.Α.). Χρηματοδοτείται από τη Merck Sharp and Dohme (USA). Οι ερευνητές δεν πληρώνονται για να σας συμπεριλάβουν στη μελέτη.

.

Έχει δοθεί άδεια για την πραγματοποίηση της μελέτης;

Η μελέτη έχει εγκριθεί από την Επιστημονική Επιτροπή και την Επιτροπή Ηθικής του ΝΕΕΣ. Η μελέτη δεν αφορά σε έρευνα για τη δραστικότητα ή την ασφάλεια κάποιου φαρμάκου. Κατά συνέπεια δεν απαιτείται άδεια από Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (<http://www.eof.gr/web/guest/clinical>)

Επικοινωνία για περισσότερες πληροφορίες

Δρ. Μαρία Βερτζώνη, ΕΚΠΑ, τηλ. 210 727 4035 και 6937 198 260

Δρ. Χρήστος Ρέππας, ΕΚΠΑ, τηλ. 210 727 4678 και 6937 179 155

Δήλωση συγκατάθεσης

Ονοματεπώνυμο εθελοντή:

1. Βεβαιώνω ότι έχω διαβάσει και καταλάβει το κείμενο στις προηγούμενες σελίδες και ότι είχα την δυνατότητα να ρωτήσω σχετικές ερωτήσεις

☐

2. Καταλαβαίνω ότι η συμμετοχή στη μελέτη είναι εθελοντική και μπορώ να αποχωρήσω όποτε θελήσω χωρίς αναφέρω τους λόγους και χωρίς τα ιατρικά και νομικά δικαιώματά μου να επηρεασθούν καθ'οιονδήποτε τρόπο.

☐

3. Καταλαβαίνω ότι οι ερευνητές έχουν γνώση του ιατρικού μου ιστορικού και δίνω την έγκρισή μου να έχουν πρόσβαση σε όλα τα δεδομένα που πιθανόν σχετίζονται με την παρούσα μελέτη. Έχω τη διαβεβαίωση των ερευνητών, ότι όλα τα δεδομένα που σχετίζονται με το άτομο μου θα θεωρηθούν υψίστης εμπιστευτικότητας για πάντα και, εάν δημοσιευτούν, θα δημοσιευτούν με τρόπο που θα καθιστά αδύνατη την ταυτοποίηση μου.

☐

4. Συμφωνώ να πάρω μέρος στη μελέτη ως εθελοντής

☐

5. Καταλαβαίνω ότι το παρόν κείμενο (συνολικά 10 σελίδες) θα υπογραφεί εις διπλού. Ένα θα δοθεί στον εθελοντή και ένα θα κρατηθεί στο αρχείο της μελέτης.

☐

Ονοματεπώνυμο Εθελοντή

Ημερομηνία και υπογραφή

Ονοματεπώνυμο Μάρτυρα

Ημερομηνία και υπογραφή

Δρ. Κωνσταντίνος Γκούμας

Ημερομηνία και υπογραφή

Τίτλος Μελέτης

Συλλογή και μερικός χαρακτηρισμός περιεχομένων του ανώτερου τμήματος του λεπτού
εντέρου υγιών ενηλίκων κατά τη διαπεπτική περίοδο

Ονοματεπώνυμο Εθελοντή: _____

Ημερομηνία Λήψης Δείγματος: _____

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Τι ώρα σταματήσατε τη λήψη τροφής χτες;

2. Πότε ήπιατε τελευταία φορά νερό και πόσο;

3. Είχατε φυσιολογικές κενώσεις μετά τις 8μ.μ.; Ναι ☐ Όχι ☐

4. Απείχατε από το κάπνισμα τις τελευταίες τρεις μέρες; Ναι ☐ Όχι ☐

Αν όχι, πόσα τσιγάρα καπνίσατε; _ _ _ _ _

5. Απείχατε από την κατανάλωση αλκοόλ τις τελευταίες τρεις μέρες; Ναι ☐ Όχι ☐

Αν όχι πόση ποσότητα καταναλώσατε; _ _ _ _ _

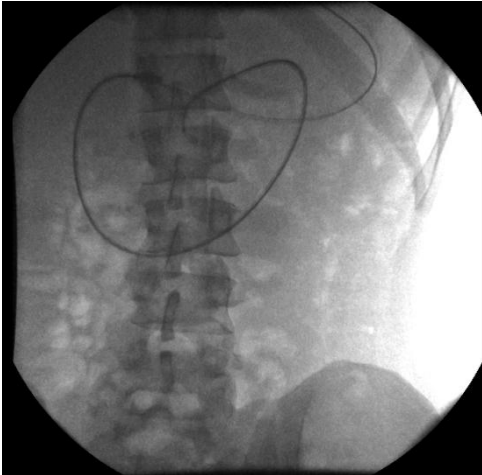
6. Καταναλώσατε οποιοδήποτε φάρμακο τις τελευταίες τρεις εβδομάδες; Ποιο(ά);

Παρατηρήσεις

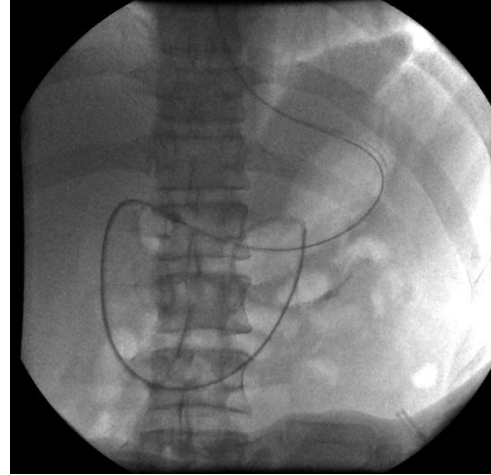
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

Αντίγραφα ακτινοσκοπικών απεικονίσεων για κάθε εθελοντή

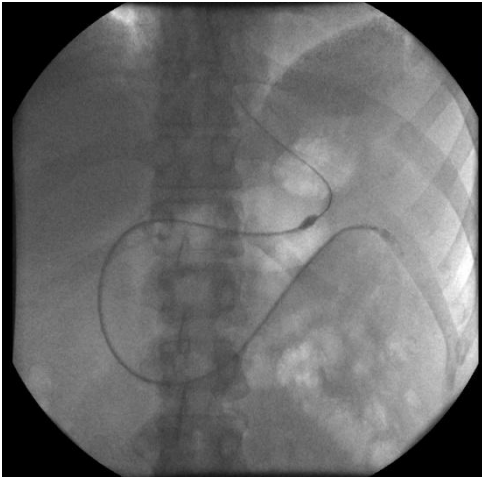
SIA-1



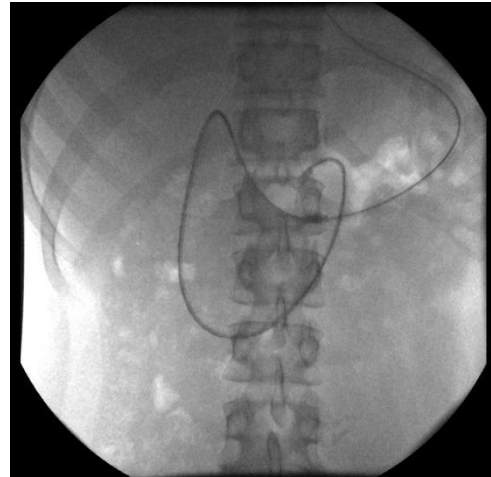
SIA-3



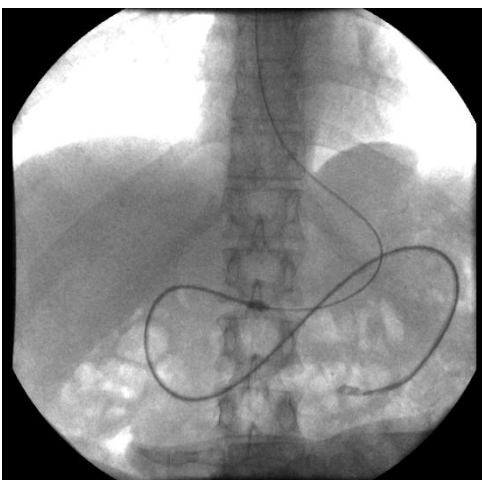
SIA-4



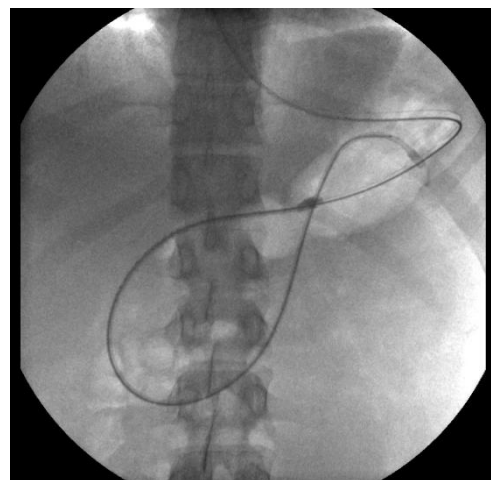
SIA-5



SIA-6



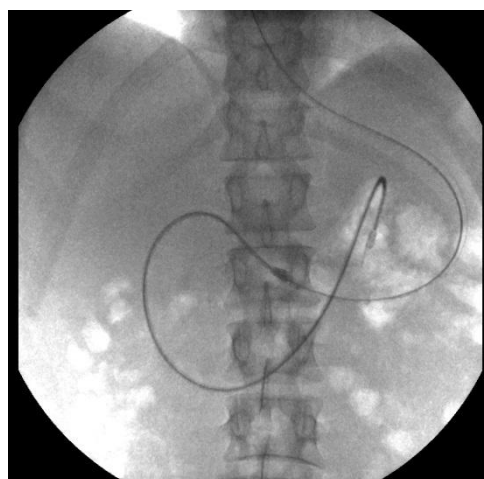
SIA-7



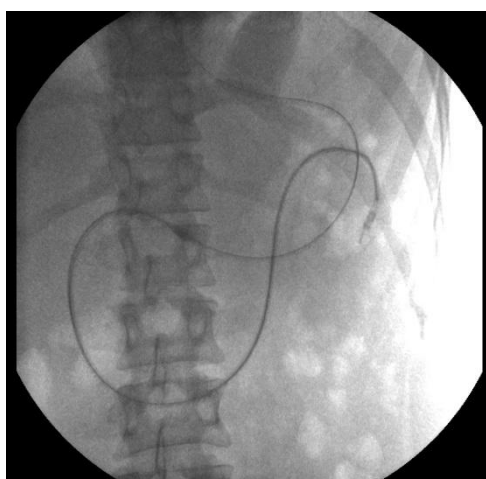
SIA-8A



SIA-8B



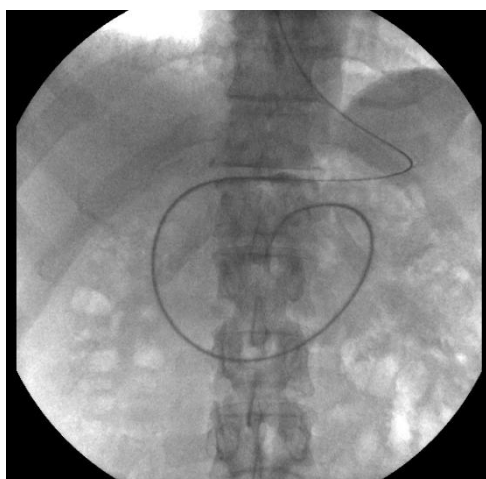
SIA-9



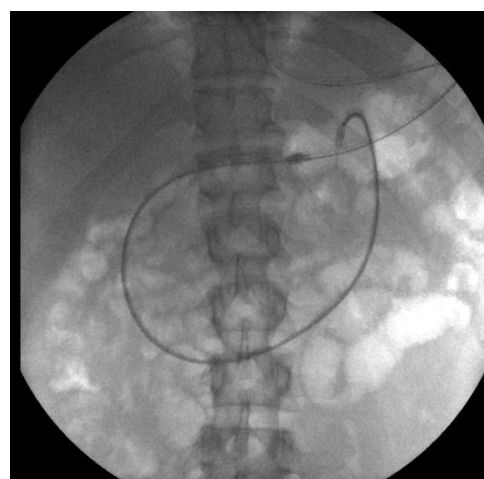
SIA-10A



SIA-10B



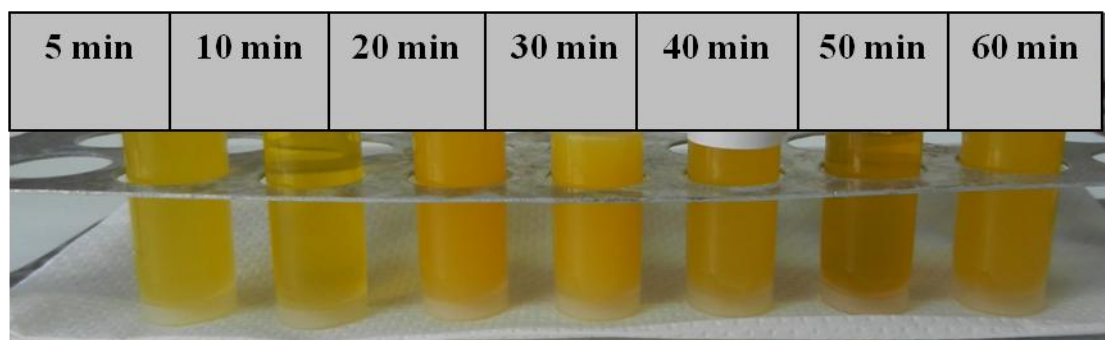
SIA-11



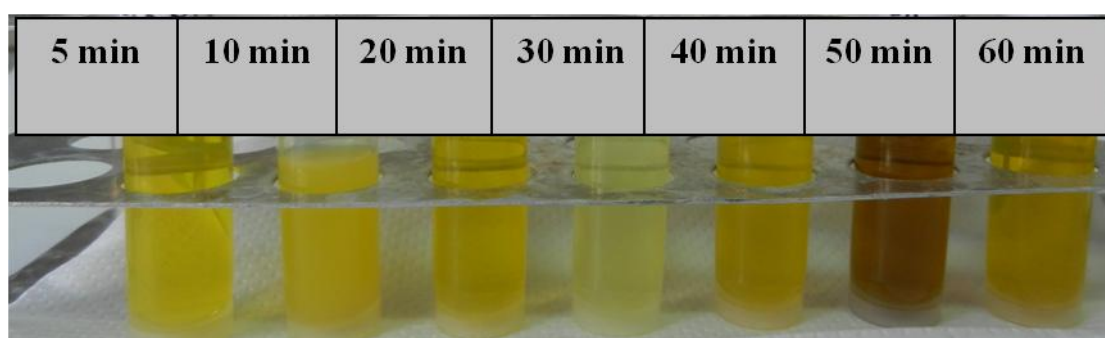
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

Φωτογραφίες δειγμάτων

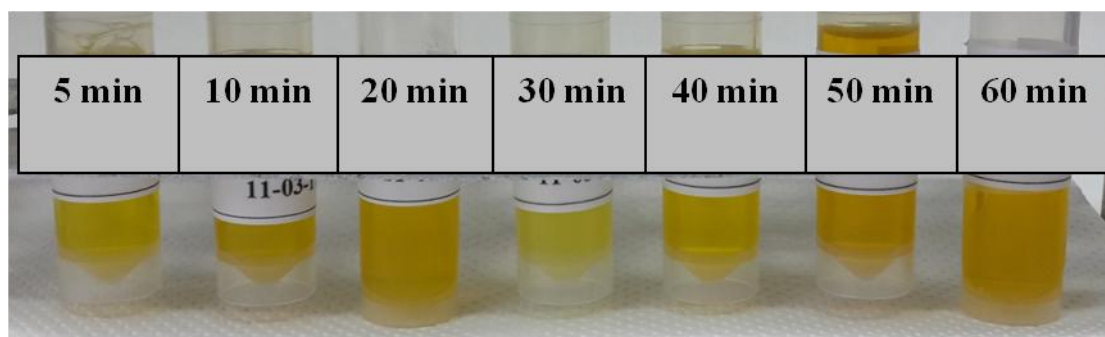
SIA-1



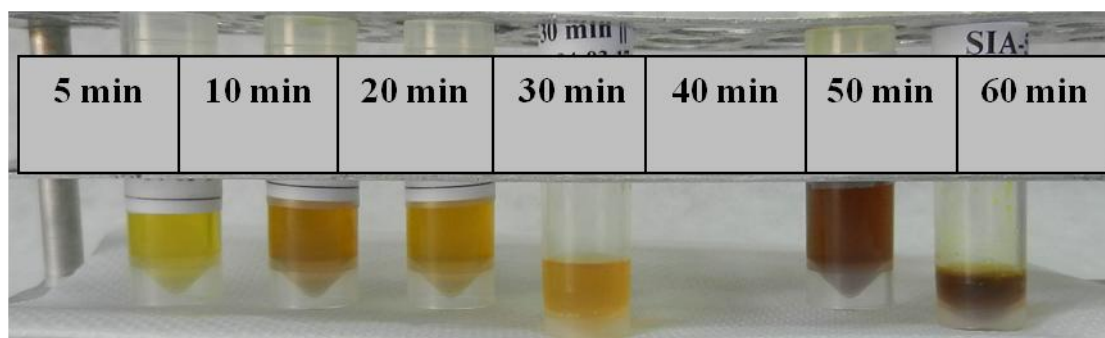
SIA-3



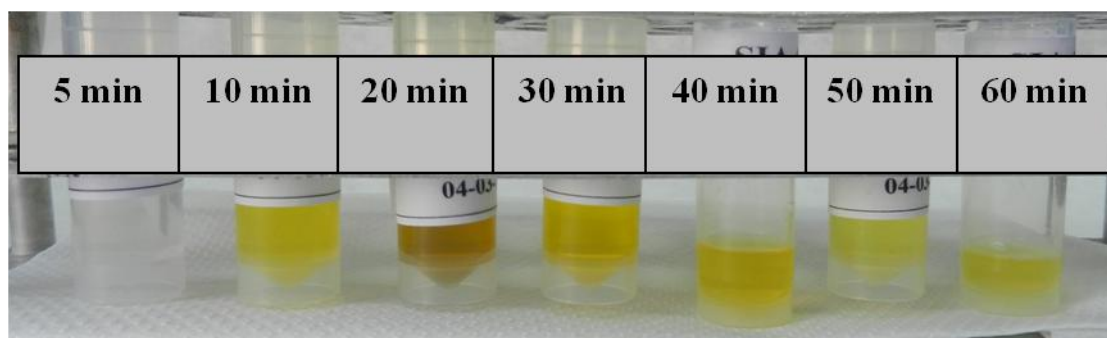
SIA-4



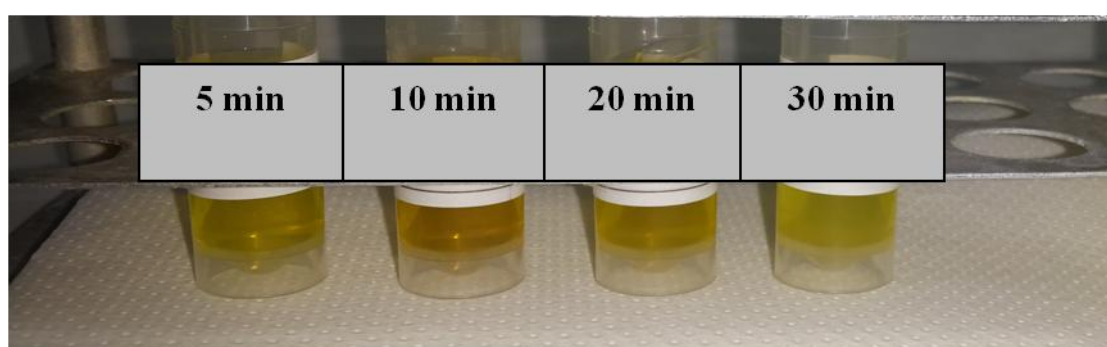
SIA-5



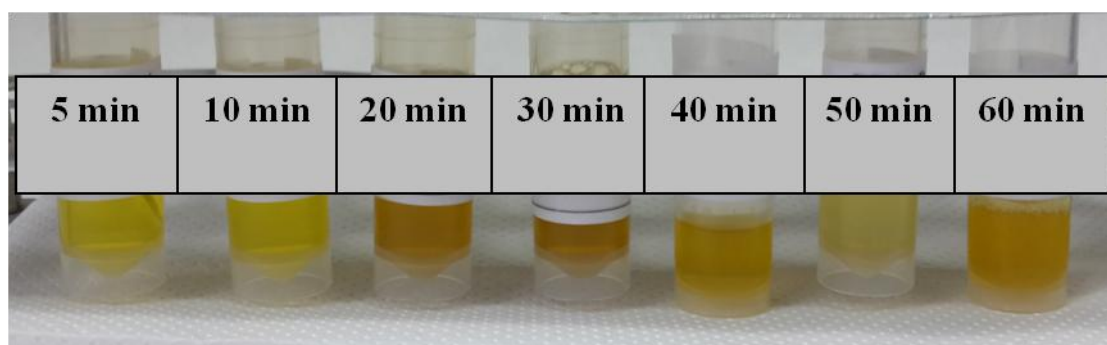
SIA-6



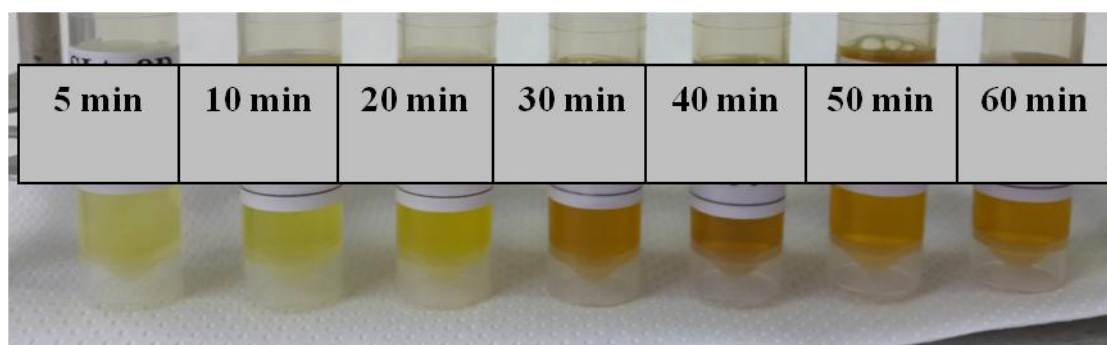
SIA-7



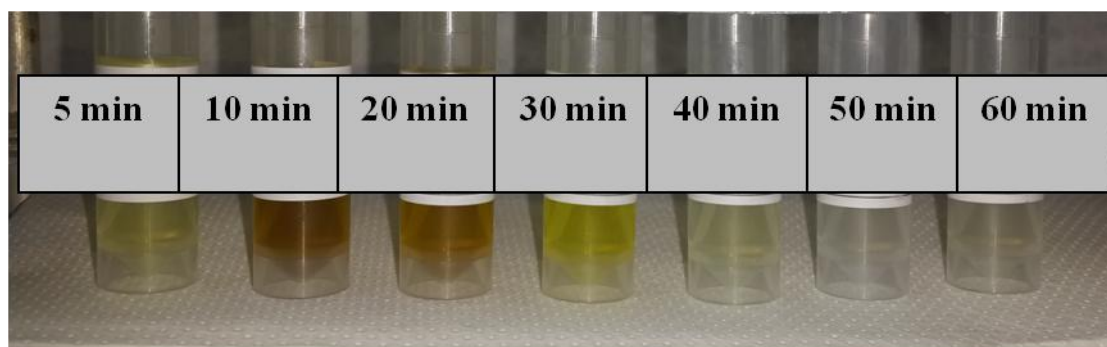
SIA-8A



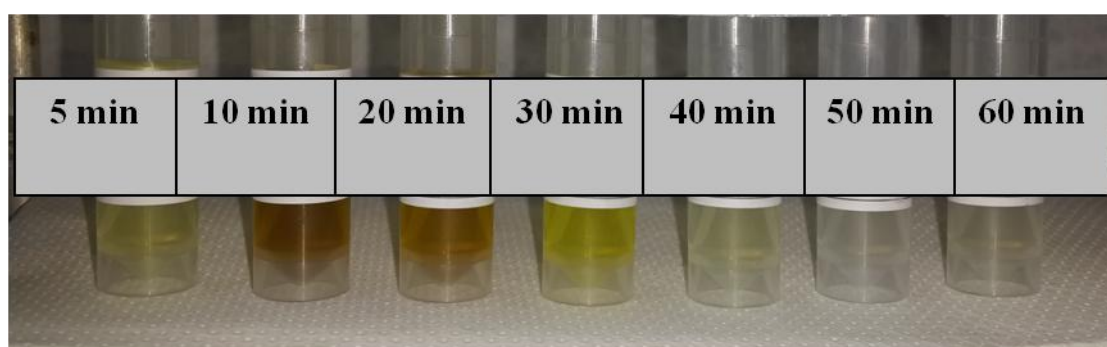
SIA-8B



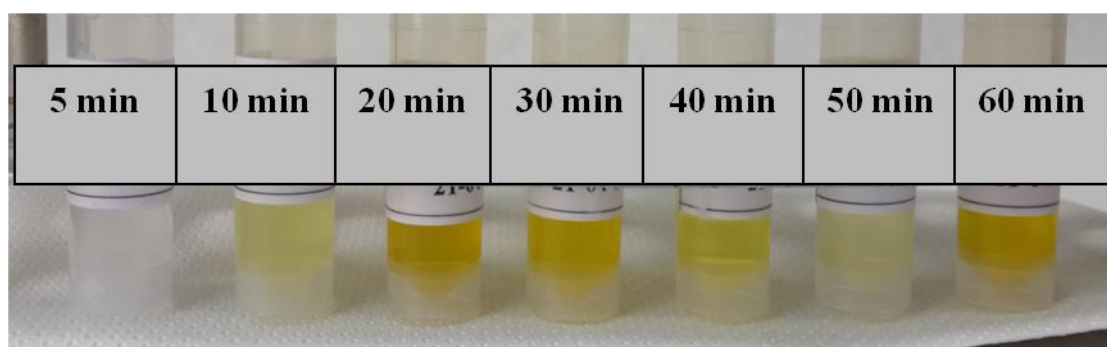
SIA-9



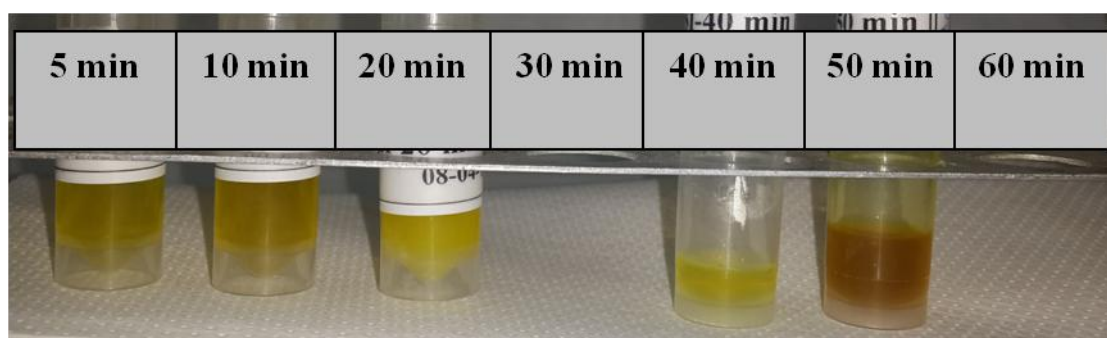
SIA-10A



SIA-10B



SIA-11



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

Σημασία του όγκου του υγρού μέσου διάλυσης στο γαστρικό διαμέρισμα

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα για να εξεταστεί η σημασία του όγκου του υγρού μέσου στο γαστρικό διαμέρισμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δισκία πιογλιταζόνης των 15 mg. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις πιογλιταζόνης στο γαστρικό διαμέρισμα σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις: βάζοντας 1 δισκίο σε 125 ml και βάζοντας 2 δισκία σε 250 ml FaSSGF επιπέδου προσομοίωσης III. Και στις δύο περιπτώσεις, είχαμε ανάδευση με ταχύτητα περιστροφής 75 rpm και σταθερή θερμοκρασία στους 37 °C. Οι ροές εξόδου από το γαστρικό διαμέρισμα είναι αυτές που χρησιμοποιούνται στη διάταξη μBioGIT (Κεφάλαιο B.6.2) και η δειγματοληψία πραγματοποιείται κάθε πέντε λεπτά σε ογκομετρικό κύλινδρο. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, όμως στο δεύτερο και τρίτο πείραμα η δειγματοληψία σταμάτησε στα 15 λεπτά. Ένα μέρος του δείγματος διηθείται από ηθμό Titan RC 0,2 μm (με απόρριψη του πρώτου ml για κορεσμό του ηθμού) για υπολογισμό της διαλυμένης ποσότητας του φαρμάκου, και το υπόλοιπο χρησιμοποιείται για την εύρεση της ολικής ποσότητας (διαλυμένου και στερεού). Από κάθε δείγμα λαμβάνεται ποσότητα 100 μl και αραιώνεται με 900 μl κινητής φάσης. Ακολουθεί ανάμιξη σε συσκευή περιδίνησης και ένεση των δειγμάτων στην HPLC.

Στους Πίνακες Π.5.1, Π.5.2, Π.5.3 και Π.5.4 παρουσιάζονται τα αναλυτικά οι διαλυμένες και οι ολικές ποσότητες πιογλιταζόνης σε FaSSGF επιπέδου προσομοίωσης III, για τις δύο διατάξεις, και στα Σχήματα Π.5.1 και Π.5.2 φαίνονται διαγραμματικά οι συγκεντρώσεις αυτές.

Πίνακας Π.5.1: Συνολική ποσότητα πιογλιταζόνης (μg/ml) στο γαστρικό διαμέρισμα με διάλυση 2 δισκίων πιογλιταζόνης (15 mg) σε 250 ml FaSSGF.

Χρόνος (min)	Ροές (ml/min)	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)				SD
		#1	#2	#3	Μέσος	
0	4,63	0	0	0	0	0
5		61,97	52,69	44,59	53,1	8,7
10		83,11	79,86	67,21	76,7	8,4
15	2,91	86,28	82,26	76,67	81,7	4,8
20		88,84	-	-	88,84	-
25	1,84	89,23	-	-	89,23	-
30		91,34	-	-	91,34	-
35	1,16	90,87	-	-	90,87	-
40		92,69	-	-	92,69	-
45	0,73	91,47	-	-	91,47	-

Πίνακας Π.5.2: Διαλυμένη ποσότητα πιογλιταζόνης (μg/ml) στο γαστρικό διαμέρισμα με διάλυση 2 δισκίων πιογλιταζόνης (15 mg) σε 250 ml FaSSGF.

Χρόνος (min)	Ροές (ml/min)	Διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)				SD
		#1	#2	#3	Μέσος	
0	4,63	0	0	0	0	0
5		54,92	49,16	42,76	48,95	6,08
10		81,51	75,62	65,15	74,1	8,3
15	2,91	84,68	81,07	73,94	79,9	5,5
20		86,15	-	-	86,15	-
25	1,84	87,37	-	-	87,37	-
30		88,25	-	-	88,25	-
35	1,16	85,32	-	-	85,32	-
40		89,52	-	-	89,52	-
45	0,73	87,68	-	-	87,68	-

Πίνακας Π.5.3: Συνολική ποσότητα πιογλιταζόνης (μg/ml) στο γαστρικό διαμέρισμα με διάλυση 1 δισκίου πιογλιταζόνης 15 mg σε 125 ml FaSSGF.

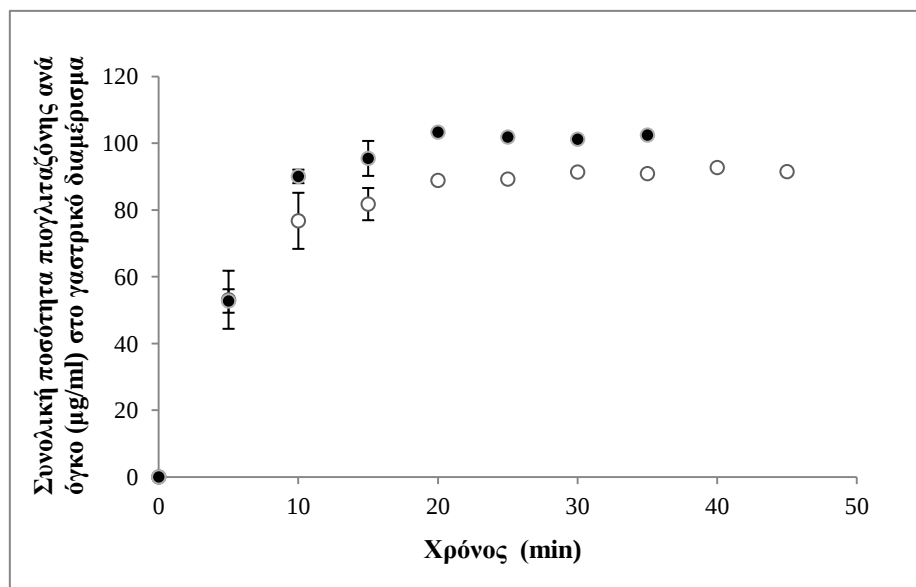
Χρόνος (min)	Ροές (ml/min)	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)				
		#1	#2	#3	Μέσος	SD
0	4,63	0	0	0	0	0
5		53,16	56,00	48,99	52,7	3,5
10		90,37	87,88	91,87	90,0	2,0
15	2,91	101,42	91,69	93,18	95,4	5,2
20		103,29	-	-	103,29	-
25	1,84	101,83	-	-	101,83	-
30		101,18	-	-	101,18	-
35	1,16	102,42	-	-	102,42	-
40		-	-	-	-	-
45	0,73	-	-	-	-	-

* Η δειγματοληψία μετά τα 35 λεπτά δεν ήταν δυνατή, γιατί ο όγκος στο γαστρικό διαμέρισμα είχε μειωθεί πολύ.

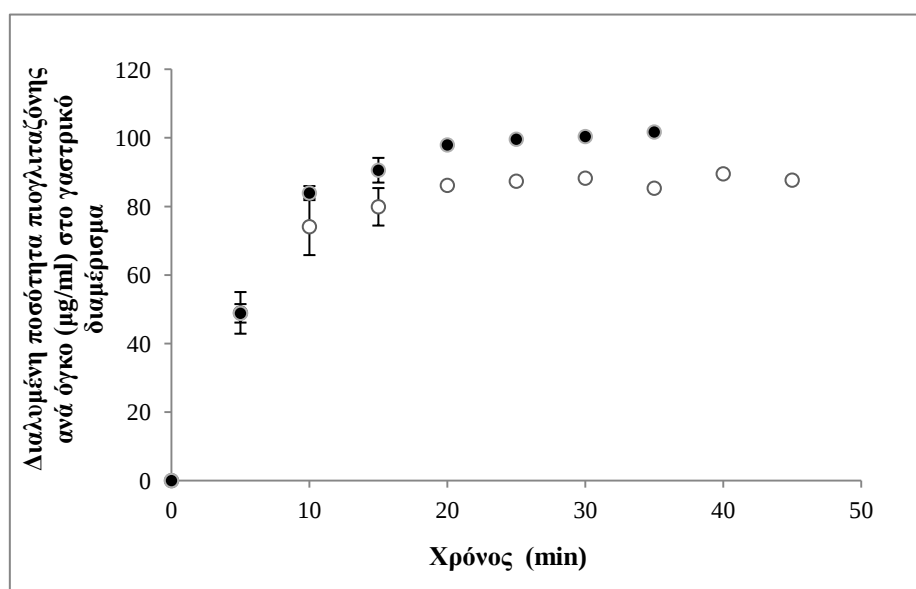
Πίνακας Π.5.4: Διαλυμένη ποσότητα πιογλιταζόνης (μg/ml) στο γαστρικό διαμέρισμα με διάλυση 1 δισκίου πιογλιταζόνης 15 mg σε 125 ml FaSSGF.

Χρόνος (min)	Ροές (ml/min)	Διαλυμένη ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)				
		#1	#2	#3	Μέσος	SD
0	4,63	0	0	0	0	0
5		47,66	51,91	46,90	48,8	2,7
10		85,88	81,78	84,06	83,9	2,0
15	2,91	94,23	87,02	90,47	90,6	3,6
20		97,95	-	-	97,95	-
25	1,84	99,61	-	-	99,61	-
30		100,40	-	-	100,40	-
35	1,16	101,72	-	-	101,72	-
40		-	-	-	-	-
45	0,73	-	-	-	-	-

* Η δειγματοληψία μετά τα 35 λεπτά δεν ήταν δυνατή, γιατί ο όγκος στο γαστρικό διαμέρισμα είχε μειωθεί πολύ.



Σχήμα Π.5.1: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις της συνολικής ποσότητας πιογλιταζόνης (μg/ml) στο γαστρικό διαμέρισμα όταν τοποθετείται 1 δισκίο σε 125 ml FaSSGF [μαύροι κύκλοι] και 2 δισκία σε 250 ml FaSSGF [λευκοί κύκλοι].



Σχήμα Π.5.2: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των συγκεντρώσεων διαλυμένης πιογλιταζόνης (μg/ml) στο γαστρικό διαμέρισμα όταν τοποθετείται 1 δισκίο σε 125 ml FaSSGF [μαύροι κύκλοι] και 2 δισκία σε 250 ml FaSSGF [λευκοί κύκλοι].

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

*Πρωτογενή δεδομένα δειγμάτων που συλλέχθηκαν από το
δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα των διατάξεων BioGIT και μBioGIT*

Πίνακας Π.6.1: Συγκέντρωση (μg/ml) διαλυμένης ποσότητας ρανιτιδίνης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη BioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συγκέντρωση Ουσίας (μg/ml)
5	#1	739,67
	#2	771,69
	#3	808,93
	Μέση Τιμή	773
	Τυπική Αποκλιση (SD)	35
15	#1	706,88
	#2	680,09
	#3	721,13
	Μέση Τιμή	703
	Τυπική Αποκλιση (SD)	21
25	#1	452,22
	#2	471,12
	#3	481,33
	Μέση Τιμή	468
	Τυπική Αποκλιση (SD)	15
35	#1	281,41
	#2	295,88
	#3	283,53
	Μέση Τιμή	286,9
	Τυπική Αποκλιση (SD)	7,8
45	#1	175,25
	#2	193,23
	#3	176,77
	Μέση Τιμή	182
	Τυπική Αποκλιση (SD)	10
55	#1	110,08
	#2	116,48
	#3	109,09
	Μέση Τιμή	111,9
	Τυπική Αποκλιση (SD)	4,0

Πίνακας Π.6.2: Συγκέντρωση (μg/ml) διαλυμένης ποσότητας ρανιτιδίνης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη μBioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συγκέντρωση Ουσίας (μg/ml)
5	#1	805,33
	#2	707,38
	#3	699,43
	Μέση Τιμή	737
	Τυπική Αποκλιση (SD)	59
15	#1	647,26
	#2	730,55
	#3	710,85
	Μέση Τιμή	696
	Τυπική Αποκλιση (SD)	44
25	#1	449,86
	#2	421,98
	#3	471,45
	Μέση Τιμή	448
	Τυπική Αποκλιση (SD)	25
35	#1	280,61
	#2	273,54
	#3	284,68
	Μέση Τιμή	279,6
	Τυπική Αποκλιση (SD)	5,6
45	#1	181,93
	#2	177,82
	#3	184,18
	Μέση Τιμή	181,3
	Τυπική Αποκλιση (SD)	3,2
55	#1	113,12
	#2	109,61
	#3	116,94
	Μέση Τιμή	113,2
	Τυπική Αποκλιση (SD)	3,7

Πίνακας Π.6.3: Διαλυμένη και συνολική ποσότητα κετοκοναζόλης ανά όγκο στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη BioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
5	#1	710,93	805,64
	#2	782,44	779,84
	#3	789,63	815,09
	Μέση Τιμή	761	800
	Τυπική Αποκλίση (SD)	44	18
15	#1	715,21	720,69
	#2	697,79	722,16
	#3	744,26	749,33
	Μέση Τιμή	719	731
	Τυπική Αποκλίση (SD)	23	16
25	#1	512,20	488,91
	#2	400,06	448,43
	#3	469,01	498,61
	Μέση Τιμή	460	479
	Τυπική Αποκλίση (SD)	57	27
35	#1	310,94	309,77
	#2	259,75	278,19
	#3	287,83	307,77
	Μέση Τιμή	286	299
	Τυπική Αποκλίση (SD)	26	18
45	#1	197,70	202,16
	#2	166,98	167,57
	#3	187,26	198,29
	Μέση Τιμή	184	189
	Τυπική Αποκλίση (SD)	16	19
55	#1	125,44	127,82
	#2	104,67	107,10
	#3	118,77	121,76
	Μέση Τιμή	116	119
	Τυπική Αποκλίση (SD)	11	11

Πίνακας Π.6.4: Διαλυμένη και συνολική ποσότητα κετοκοναζόλης ανά όγκο στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη μBioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
5	#1	733,42	797,06
	#2	724,84	809,24
	#3	798,16	1162,18
	Μέση Τιμή	752	923
	Τυπική Αποκλίση (SD)	40	207
15	#1	715,40	709,50
	#2	687,42	734,51
	#3	640,00	679,37
	Μέση Τιμή	681	708
	Τυπική Αποκλίση (SD)	38	28
25	#1	467,14	461,98
	#2	445,94	468,93
	#3	411,13	431,63
	Μέση Τιμή	441	454
	Τυπική Αποκλίση (SD)	28	20
35	#1	275,27	273,89
	#2	272,82	286,35
	#3	254,16	300,72
	Μέση Τιμή	267	287
	Τυπική Αποκλίση (SD)	12	13
45	#1	176,56	177,15
	#2	177,43	181,80
	#3	163,69	169,42
	Μέση Τιμή	172,6	176,1
	Τυπική Αποκλίση (SD)	7,7	6,3
55	#1	109,76	110,02
	#2	110,65	115,27
	#3	102,90	105,38
	Μέση Τιμή	107,8	110,2
	Τυπική Αποκλίση (SD)	4,2	4,9

Πίνακας Π.6.5: Διαλυμένη και συνολική ποσότητα ανά όγκο και θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού πιογλιταζόνης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη BioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Θερμοδυναμική Διαλυτότητα Κορεσμού (μg/ml)
5	#1	10,38	19,30	δ.μ
	#2	8,49	21,94	δ.μ
	#3	9,39	21,63	0,39
	Μέση Τιμή	9,42	21	0,39
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,94	1,4	-
15	#1	10,55	30,49	δ.μ
	#2	10,72	30,62	δ.μ
	#3	11,79	30,40	0,40
	Μέση Τιμή	11,02	30,50	0,40
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,67	0,11	-
25	#1	11,46	23,64	δ.μ
	#2	10,80	22,57	δ.μ
	#3	11,97	20,23	0,36
	Μέση Τιμή	11,41	22,1	0,36
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,59	1,7	-
35	#1	10,71	15,63	δ.μ
	#2	10,06	14,58	δ.μ
	#3	10,37	12,22	0,36
	Μέση Τιμή	10,38	14,1	0,36
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,32	1,7	-
45	#1	8,80	9,92	δ.μ
	#2	8,20	9,11	δ.μ
	#3	7,38	7,51	0,46
	Μέση Τιμή	8,13	8,8	0,46
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,71	1,2	-

*δ.μ : δεν έγινε μέτρηση

Πίνακας Π.6.6: Διαλυμένη και συνολική ποσότητα ανά όγκο και θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού πιογλιταζόνης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη μBioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Θερμοδυναμική Διαλυτότητα Κορεσμού (μg/ml)
5	#1	7,15	26,37	δ.μ
	#2	7,62	25,29	0,63
	#3	7,28	27,53	δ.μ
	Μέση Τιμή	7,35	26,4	0,63
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,24	1,1	-
15	#1	9,90	32,73	δ.μ
	#2	11,39	32,75	0,64
	#3	11,14	33,57	δ.μ
	Μέση Τιμή	10,81	33,02	0,64
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,80	0,48	-
25	#1	11,07	21,22	δ.μ
	#2	11,05	22,94	0,59
	#3	11,32	20,48	δ.μ
	Μέση Τιμή	11,15	21,5	0,59
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,15	1,3	-
35	#1	9,97	12,93	δ.μ
	#2	10,15	14,10	0,55
	#3	10,26	12,56	δ.μ
	Μέση Τιμή	10,12	13,20	0,55
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,14	0,80	-
45	#1	7,75	7,98	δ.μ
	#2	8,13	8,99	0,59
	#3	7,66	8,05	δ.μ
	Μέση Τιμή	7,84	8,34	0,59
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,25	0,57	-

*δ.μ : δεν έγινε μέτρηση

Πίνακας Π.6.7: Διαλυμένη και συνολική ποσότητα ανά όγκο και θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της δραστικής ουσίας A (δόση 12 mg) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη BioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Θερμοδυναμική Διαλυτότητα Κορεσμού (μg/ml)
5	#1	14,26	14,25	9,33
	#2	12,92	13,94	8,83
	#3	11,09	11,09	10,25
	Μέση Τιμή	12,8	13,1	9,47
	Τυπική Αποκλιση (SD)	1,6	1,7	0,72
15	#1	12,77	12,95	8,95
	#2	18,55	19,18	10,09
	#3	15,25	15,38	9,87
	Μέση Τιμή	15,5	15,8	9,64
	Τυπική Αποκλιση (SD)	2,9	3,1	0,60
25	#1	10,34	10,51	8,22
	#2	16,22	16,58	9,37
	#3	13,16	13,33	9,96
	Μέση Τιμή	13,2	13,5	9,18
	Τυπική Αποκλιση (SD)	2,9	3,0	0,89
35	#1	6,41	6,53	7,72
	#2	10,61	11,16	8,64
	#3	8,87	8,90	8,00
	Μέση Τιμή	8,6	8,9	8,12
	Τυπική Αποκλιση (SD)	2,1	2,3	0,47
45	#1	3,52	3,58	7,12
	#2	5,01	5,56	6,99
	#3	4,86	4,90	7,54
	Μέση Τιμή	4,46	4,7	7,22
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,82	1,0	0,29

Πίνακας Π.6.8: Διαλυμένη και συνολική ποσότητα ανά όγκο και θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της δραστικής ουσίας Α (δόση 150 mg) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη BioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Θερμοδυναμική Διαλυτότητα Κορεσμού (μg/ml)
5	#1	202,28	207,51	14,05
	#2	171,73	176,07	22,18
	#3	174,37	186,30	18,80
	Μέση Τιμή	183	190	18,3
	Τυπική Αποκλιση (SD)	17	16	4,1
15	#1	209,78	226,10	15,86
	#2	160,81	192,69	19,59
	#3	170,53	224,00	17,61
	Μέση Τιμή	180	214	17,7
	Τυπική Αποκλιση (SD)	26	19	1,9
25	#1	134,89	147,93	14,19
	#2	97,17	116,05	13,60
	#3	98,98	143,30	17,30
	Μέση Τιμή	110	136	15
	Τυπική Αποκλιση (SD)	21	17	2,0
35	#1	74,66	92,71	17,39
	#2	36,99	44,17	11,30
	#3	61,94	82,66	13,63
	Μέση Τιμή	58	73	14
	Τυπική Αποκλιση (SD)	19	26	3,1
45	#1	29,74	37,79	10,59
	#2	5,35	7,18	8,08
	#3	24,25	35,25	12,44
	Μέση Τιμή	20	27	10,4
	Τυπική Αποκλιση (SD)	13	17	2,2

Πίνακας Π.6.9: Διαλυμένη και συνολική ποσότητα ανά όγκο και θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της δραστικής ουσίας B (δόση 10 mg) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη BioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Θερμοδυναμική Διαλυτότητα Κορεσμού (μg/ml)
5	#1	10,58	10,75	δ.μ
	#2	9,71	10,39	14,00
	#3	8,43	8,90	δ.μ
	Μέση Τιμή	9,6	10,01	14,00
	Τυπική Αποκλιση (SD)	1,1	0,98	-
15	#1	19,77	19,93	δ.μ
	#2	20,99	20,96	15,09
	#3	18,73	18,32	δ.μ
	Μέση Τιμή	19,8	19,7	15,09
	Τυπική Αποκλιση (SD)	1,1	1,3	-
25	#1	14,07	14,49	δ.μ
	#2	16,35	16,39	13,93
	#3	17,77	17,82	δ.μ
	Μέση Τιμή	16,1	16,2	13,93
	Τυπική Αποκλιση (SD)	1,9	1,7	-
35	#1	8,76	8,94	δ.μ
	#2	10,28	10,37	13,74
	#3	12,84	12,73	δ.μ
	Μέση Τιμή	10,6	10,7	13,74
	Τυπική Αποκλιση (SD)	2,1	1,9	-
45	#1	δ.μ	δ.μ	δ.μ
	#2	5,92	5,91	13,74
	#3	8,07	7,92	δ.μ
	Μέση Τιμή	7	6,9	13,74
	Τυπική Αποκλιση (SD)	1,5	1,4	-

*δ.μ : δεν έγινε μέτρηση

Πίνακας Π.6.10: Διαλυμένη και συνολική ποσότητα ανά όγκο και θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της δραστικής ουσίας B (δόση 50 mg) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, με την διάταξη BioGIT.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Θερμοδυναμική Διαλυτότητα Κορεσμού (μg/ml)
5	#1	30,18	38,05	δ.μ
	#2	25,87	36,41	15,41
	#3	29,61	35,35	δ.μ
	Μέση Τιμή	28,5	36,6	15,41
	Τυπική Αποκλιση (SD)	2,3	1,4	-
15	#1	26,56	97,79	δ.μ
	#2	24,03	90,32	15,24
	#3	24,63	93,71	δ.μ
	Μέση Τιμή	25,1	93,9	15,24
	Τυπική Αποκλιση (SD)	1,3	3,7	-
25	#1	23,85	84,67	δ.μ
	#2	23,80	78,39	14,29
	#3	24,84	89,29	δ.μ
	Μέση Τιμή	24,16	84,1	14,29
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,59	5,5	-
35	#1	25,29	58,25	δ.μ
	#2	24,67	58,32	13,98
	#3	24,20	61,70	δ.μ
	Μέση Τιμή	24,72	59	13,98
	Τυπική Αποκλιση (SD)	0,55	2,0	-
45	#1	20,77	36,70	δ.μ
	#2	23,07	37,13	13,84
	#3	22,84	38,76	δ.μ
	Μέση Τιμή	22,2	37,5	13,84
	Τυπική Αποκλιση (SD)	1,3	1,1	-

*δ.μ : δεν έγινε μέτρηση

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7

Έλεγχος προσρόφησης ηθμών

Πρίν την εκτέλεση πειραμάτων με τις δραστικές ουσίες Α και Β στις διατάξεις μελέτης ενδοαυλικής συμπεριφοράς, έγιναν προκαταρκτικά πειράματα για τον έλεγχο της προσρόφησής τους σε ηθμούς μεγέθους πόρων 0,2 ή 0,45 μm (Titan RC) και 1 μm (Millipore Merck). Ο έλεγχος προσρόφησης για την πιογλιταζόνη σε ηθμούς Titan RC 0,2 μm , καθώς και των δραστικών ουσιών Α και Β σε ηθμούς Anotop 0,1 μm παρουσιάζονται στο Παράρτημα Π.8.

Σε γυάλινα φιαλίδια των 4ml, μεταφέρεται περίσσεια (3 mg) δραστικής ουσίας σε 3 ml FaSSIF επιπέδου προσομοίωσης II. Μετά από ανακίνηση, τα φιαλίδια τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο ανακινούμενο υδατόλουτρο (37 °C, 75 rpm), για περίπου 24 ώρες, για επίτευξη διαλυτότητας κορεσμού. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια συνενώνονται ανά δύο σε γυάλινες σύριγγες των 5 ml με προσαρμοσμένο ηθμό στο άκρο τους και ακολουθεί διήθηση. Το πρώτο ml απορρίπτεται, για να γίνει κορεσμός του ηθμού. Για τους ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm γίνεται κορεσμός με 2 ml, λόγω μεγαλύτερης διαμέτρου του ηθμού. Το διήθημα, επαναδιηθείται από καινούριο ηθμό. Από την διαφορά των συγκεντρώσεων στα δύο διηθήματα, υπολογίζεται το ποσοστό προσρόφησης. Για τους ηθμούς Millipore 1 μm , η προσρόφηση ελέγχεται και με δεύτερη τεχνική. Διηθημένο διάλυμα (μέσω ηθμών 0,1 μm ή 0,45 μm), διηθείται μέσω ηθμών 1 μm και από την διαφορά των δύο συγκεντρώσεων υπολογίζεται το ποσοστό προσρόφησης.

Στους πίνακες Π.7.1, Π.7.2 και Π.7.3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την προσρόφηση των δραστικών ουσιών Α και Β σε ηθμούς αναγεννημένης κυτταρίνης Titan RC. Στους Πίνακες Π.7.4 και Π.7.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για έλεγχο προσρόφησης της δραστικής ουσίας και της φαρμακοτεχνικής μορφής της δραστικής ουσίας Β σε ηθμούς Millipore Merck 1 μm , αντίστοιχα.

Πίνακας Π.7.1: Προσρόφηση δραστικής ουσίας Α σε ηθμούς Titan RC 0,2 μm, έπειτα από παραμονή σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (37 °C, 75 rpm), για 21 ώρες.

Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
#1	1 ^η	7,7	3,9
	2 ^η	7,4	
#2	1 ^η	7,5	1,2
	2 ^η	7,5	
#3	1 ^η	7,5	1,1
	2 ^η	7,5	

Πίνακας Π.7.2: Προσρόφηση δραστικής ουσίας Β σε ηθμούς Titan RC 0,2 μm, έπειτα από παραμονή σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (37 °C, 75 rpm), για 23 ώρες.

Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
#1	1 ^η	10,8	22,6
	2 ^η	8,4	
#2	1 ^η	10,5	20,0
	2 ^η	8,4	
#3	1 ^η	10,4	16,0
	2 ^η	8,7	

Πίνακας Π.7.3: Προσρόφηση δραστικής ουσίας Β σε ηθμούς Titan RC 0,45 μm, έπειτα από παραμονή σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (37 °C, 75 rpm), για 23 ώρες.

Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
#1	1 ^η	13,5	-1,7
	2 ^η	13,8	
#2	1 ^η	13,5	-0,9
	2 ^η	13,6	
#3	1 ^η	13,2	-1,7
	2 ^η	13,4	

Πίνακας Π.7.4: Προσρόφηση δραστικής ουσίας B-API σε ηθμούς Millipore (Merck) 1μm, έπειτα από παραμονή σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (37 °C, 75 rpm), για 28 ώρες.

Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
#1	1 ^η (Millipore 1μm)	20,25	25,7
	2 ^η (Millipore 1μm)	15,05	
#2	1 ^η (Whatman Anotop 0,1 μm)	13,56	35,3
	2 ^η (Millipore 1μm)	8,77	
#3	1 ^η (Titan RC 0,45 μm)	12,88	31,2
	2 ^η (Millipore 1μm)	8,87	
#4	1 ^η (Titan RC 0,45 μm)	12,88	41,8
	2 ^η (Millipore 1μm)	7,50	

Πίνακας Π.7.5: Προσρόφηση δραστικής ουσίας B-Intermediate σε ηθμούς Millipore (Merck) 1μm, έπειτα από παραμονή σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (37 °C, 75 rpm), για 28 ώρες.

Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
#1	1 ^η (Millipore 1μm)	40,80	8,0
	2 ^η (Millipore 1μm)	37,53	
#2	1 ^η (Titan RC 0,45 μm)	23,87	20,9
	2 ^η (Millipore 1μm)	18,88	
#3	1 ^η (Titan RC 0,45 μm)	23,87	29,0
	2 ^η (Millipore 1μm)	16,95	
#4	1 ^η (Titan RC 0,45 μm)	23,87	24,7
	2 ^η (Millipore 1μm)	17,98	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8

*Προκαταρκτικά πειράματα για βελτιστοποίηση χειρισμού δειγμάτων από το
δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα*

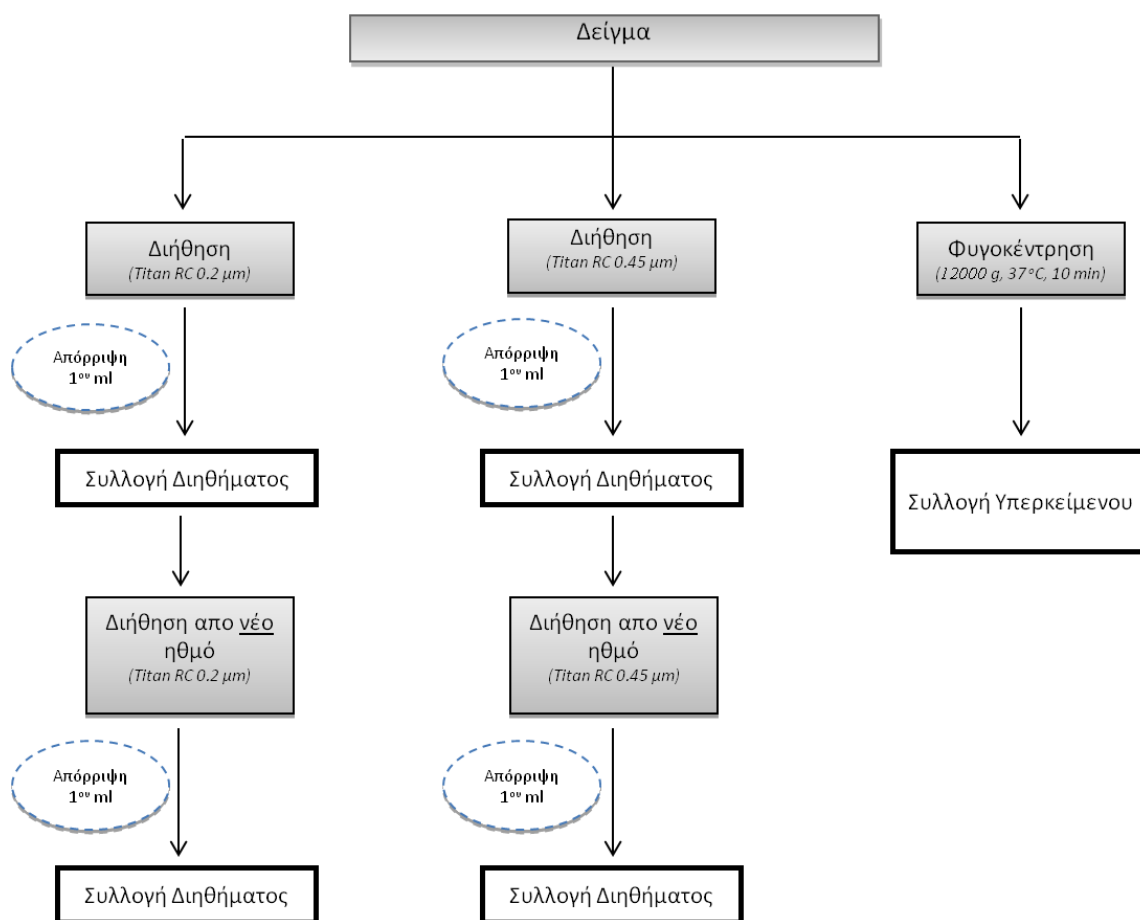
Για την εκλογή της αποτελεσματικότερης μεθόδου διαχωρισμού των στερεών σωματιδίων δειγμάτων των δραστικών ουσιών πιογλιταζόνη, δραστική ουσία Α και δραστική ουσία Β, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα όπου αξιολογήθηκαν: η επάρκεια διήθησης από ηθμούς (Titan RC 0,2 μm , Titan RC 0,45 μm , Whatman Anotop 10 0,1 μm), η φυγοκέντρωση (12000 g, 37 °C, 10 λεπτά) και η υπερφυγοκέντρωση (300000 g, 37 °C, 30 λεπτά). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο για την φαρμακολογικά δραστική ουσία (API) όσο και για την φαρμακοτεχνική μορφή (Intermediate), σε περιβάλλον μέσου προσομοίωσης δωδεκαδακτύλου επιπέδου προσομοίωσης ΙΙ (FaSSIF) και σε αναρροφηθέντα εντερικά υγρά εθελοντών κατά την διαπεπτική περίοδο (Human Intestinal Fluids - HIF_{fasted}).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: σε σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια των 4 ml προστίθεται περίσσεια ουσίας (0,003 g API ή Intermediate) και 3 ml μέσου διάλυσης (FaSSIF ή HIF_{fasted}). Τα φιαλίδια τοποθετούνται για περίπου 24 ώρες σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (75 rpm, 37 °C), για επίτευξη διαλυτότητας κορεσμού.

Π.8.1 Χειρισμός πιογλιταζόνης

Μετά την επώαση, τα φιαλίδια με όμοιο περιεχόμενο (API σε HIF_{fasted} και API σε FaSSIF) συνενώθηκαν σε ξεχωριστούς γυάλινους περιέκτες αντίστοιχα, και μετά από καλή ανάμιξη, ακολουθούνταν η εξής διαδικασία: από 2 ml δείγματος μεταφέρονταν σε πλαστικούς περιέκτες για φυγοκέντρωση, και από το υπόλοιπο περιεχόμενο, ένα μέρος διηθούνταν από ηθμούς Titan RC 0,2 μm και η υπόλοιπη ποσότητα, διηθούνταν από ηθμούς Titan RC 0,45 μm (2 φορές, όταν αυτό ήταν εφικτό, για να εκτιμηθεί και το ποσοστό προσρόφησης).

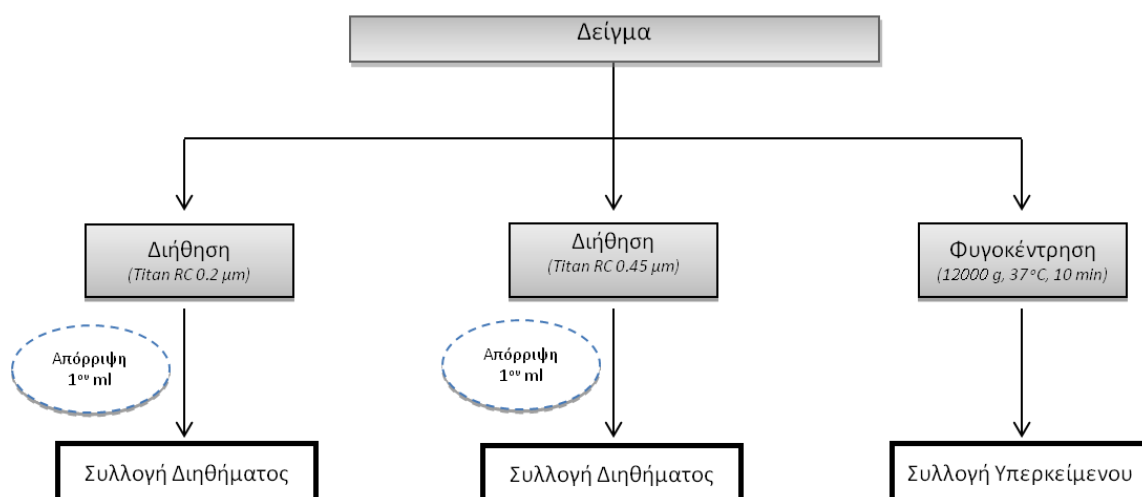
Τα αποτελέσματα για την ουσία πιογλιταζόνη παρουσιάζονται στα Σχήματα Π.8.1.1 και Π.8.1.2 και στους Πίνακες Π.8.1.1 και Π.8.1.2.



Σχήμα Π.8.1.1: Χειρισμός δειγμάτων πιογλιταζόνη-API σε FaSSIF.

Πίνακας Π.8.1.1: Συγκέντρωση (μg/ml) πιογλιταζόνης μετά από διήθηση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περίσσειας σε FaSSIF στους 37 °C.

Διαδικασία	Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
Διήθηση (Titan RC 0,2 μm)	#1	1 ^η	0,50	4,0
		2 ^η	0,48	
	#2	1 ^η	0,52	1,5
		2 ^η	0,51	
	#3	1 ^η	0,47	-3,1
		2 ^η	0,49	
Διήθηση (Titan RC 0,45 μm)	#1	1 ^η	0,40	-2,5
		2 ^η	0,40	
	#2	1 ^η	0,50	0,6
		2 ^η	0,50	
	#3	1 ^η	0,48	0,8
		2 ^η	0,48	
Φυγοκέντρωση (12000 g, 37 °C, 10 min)	#1	-	0,56	
	#2	-	0,55	
	#3	-	0,51	



Σχήμα Π.8.1.2: Χειρισμός δειγμάτων πιογλιταζόνη-API σε HIF_{fasted}.

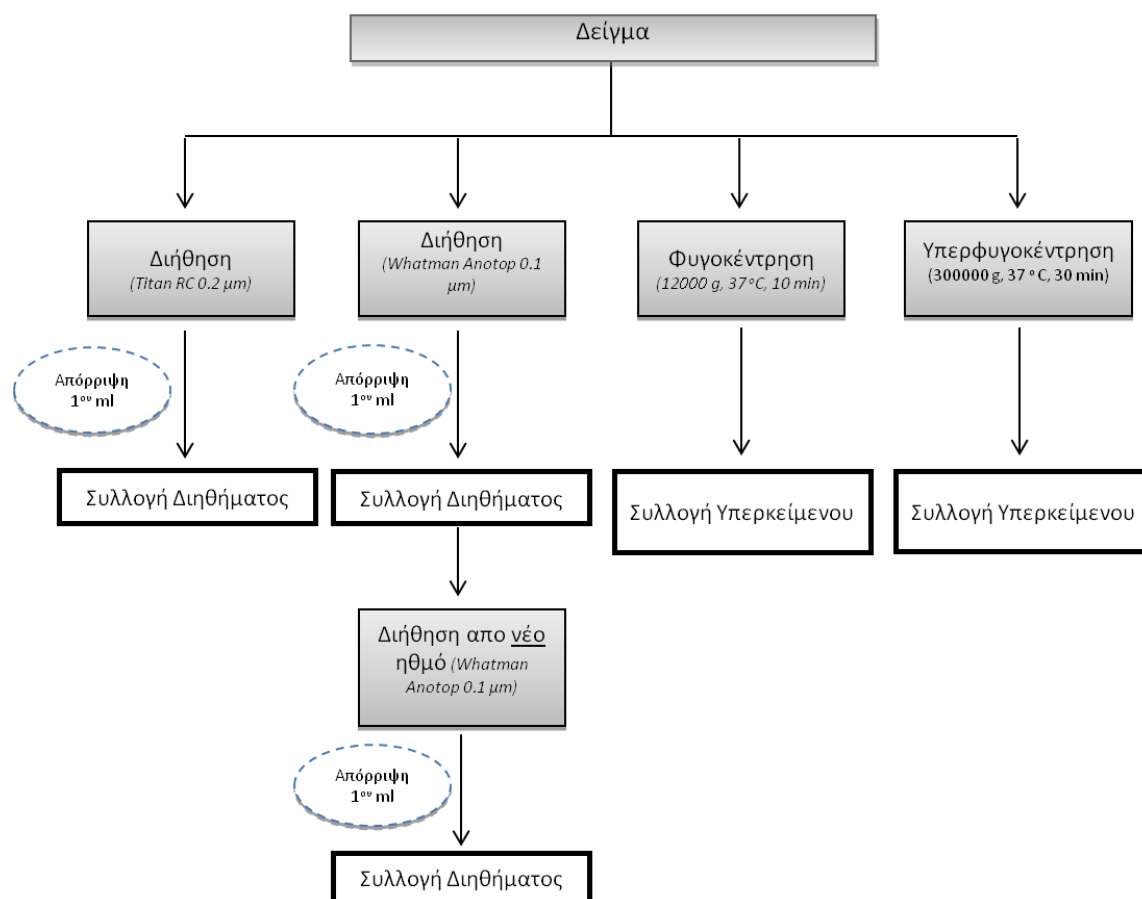
Πίνακας Π.8.1.2: Συγκέντρωση (μg/ml) πιογλιταζόνης μετά από διήθηση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περίσσειας σε HIF_{fasted} στους 37 °C.

Διαδικασία	Δείγμα	Συγκέντρωση (μg/ml)
Διήθηση (Titan RC 0,2 μm)	#1	0,80
Διήθηση (Titan RC 0,45 μm)	#1	0,70
Φυγοκέντρωση (12000 g, 37°C, 10 min)	#1	0,71
	#2	0,76
	#3	0,71

Π.8.2 Χειρισμός δραστηκής ουσίας A

Μετά την επώαση, τα φιαλίδια με όμοιο περιεχόμενο (API σε HIF_{fasted}, API σε FaSSIF, Intermediate σε HIF_{fasted} και Intermediate σε FaSSIF) συνενώνονταν σε ξεχωριστούς γυάλινους περιέκτες, αντίστοιχα, και μετά από καλή ανάμιξη, ακολουθούνταν η εξής διαδικασία: 11,5 ml δείγματος μεταφερόταν με γυάλινη σύριγγα σε πλαστικό σωλήνα και σφραγίζονταν για υπερφυγοκέντρωση, από 2 ml δείγματος μεταφέρονταν σε πλαστικούς περιέκτες για φυγοκέντρωση, και από το υπόλοιπο περιεχόμενο, ένα μέρος διηθούνταν από ηθμούς Anotop 0,1 μm (2 φορές για να εκτιμηθεί και το ποσοστό προσρόφησης) και το υπόλοιπο διηθούνταν από ηθμούς αναγεννημένης κυτταρίνης 0,2 μm (μία φορά γιατί η προσρόφηση είχε προσδιοριστεί με προηγούμενα πειράματα) (Παράρτημα Π.7).

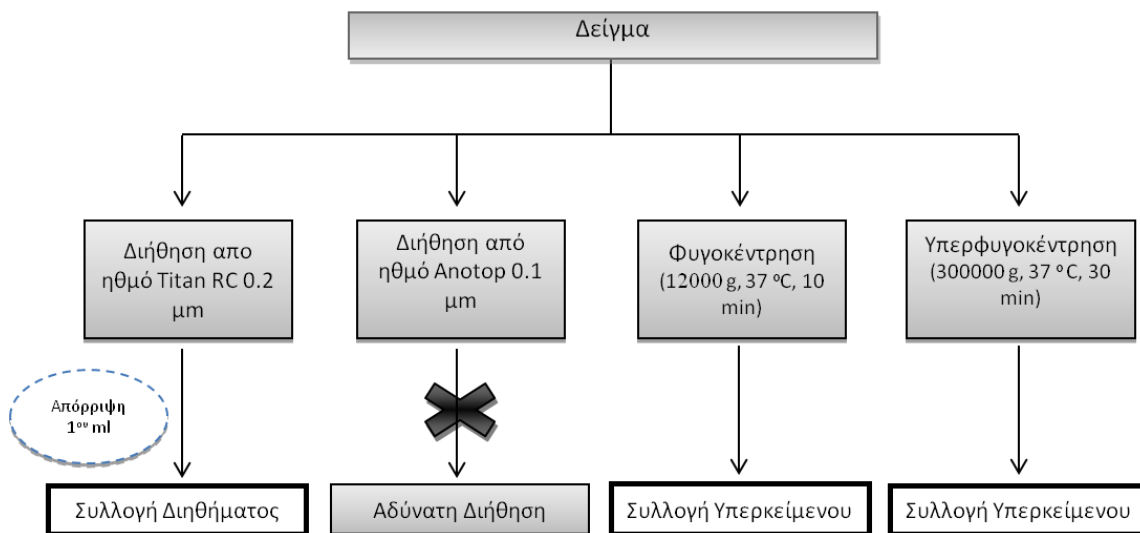
Τα αποτελέσματα για την δραστηκή ουσία A παρουσιάζονται στα Σχήματα Π.8.2.1 και Π.8.2.2 και στους Πίνακες Π.8.2.1 και Π.8.2.2.



Σχήμα Π.8.2.1: Χειρισμός δειγμάτων δραστικής ουσίας A-API σε FaSSIF.

Πίνακας Π.8.2.1: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής ουσίας A-API μετά από διήθηση, φυγοκέντρηση και υπερφυγοκέντρηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περισσειας σε FaSSIF στους 37 °C

Διαδικασία	Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
Διήθηση (Whatman Anotop 0,1 μm)	#1	1 ^η	6,86	3,1
		2 ^η	6,65	
	#2	1 ^η	6,83	2,5
		2 ^η	6,66	
	#3	1 ^η	6,77	2,7
		2 ^η	6,59	
Διήθηση (Titan RC 0,2 μm)	#1	-	6,74	
	#2	-	6,77	
	#3	-	6,79	
Φυγοκέντρηση (12000 g, 37 °C, 10 min)	#1	-	7,16	
	#2	-	6,87	
	#3	-	6,92	
Υπερφυγοκέντρηση (300000 g, 37 °C, 10 min)	#1	-	6,62	
	#2	-	6,70	
	#3	-	6,63	

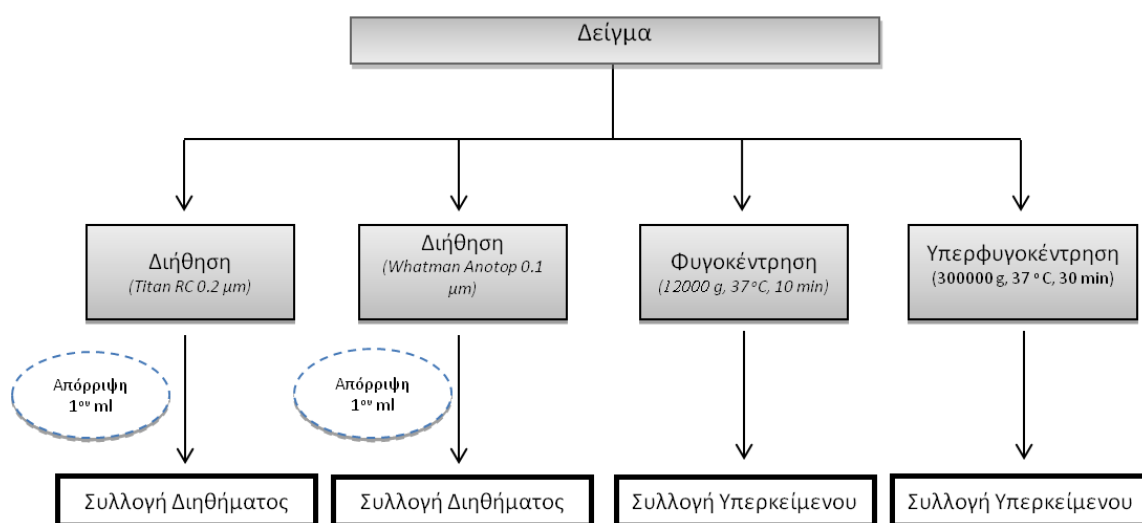


Σχήμα Π.8.2.2: Χειρισμός δειγμάτων δραστικής ουσίας A-API σε HIF_{fasted}.

Πίνακας Π.8.2.2: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής ουσίας A-API μετά από διήθηση, φυγοκέντρηση και υπερφυγοκέντρηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περισσειας σε HIF_{fasted} στους 37 °C.

Διαδικασία	Δείγμα	Συγκέντρωση (μg/ml)
Διήθηση (Whatman Anotop 0,1 μm)	ΔΜ	ΔΜ
Διήθηση (Titan RC 0,2 μm)	#1	6,24
Φυγοκέντρηση (12000 g, 37 °C, 10 min)	#1	6,42
	#2	6,20
	#3	6,22
Υπερφυγοκέντρηση (300000 g, 37 °C, 30 min)	#1	6,16
	#2	6,13
	#3	6,01

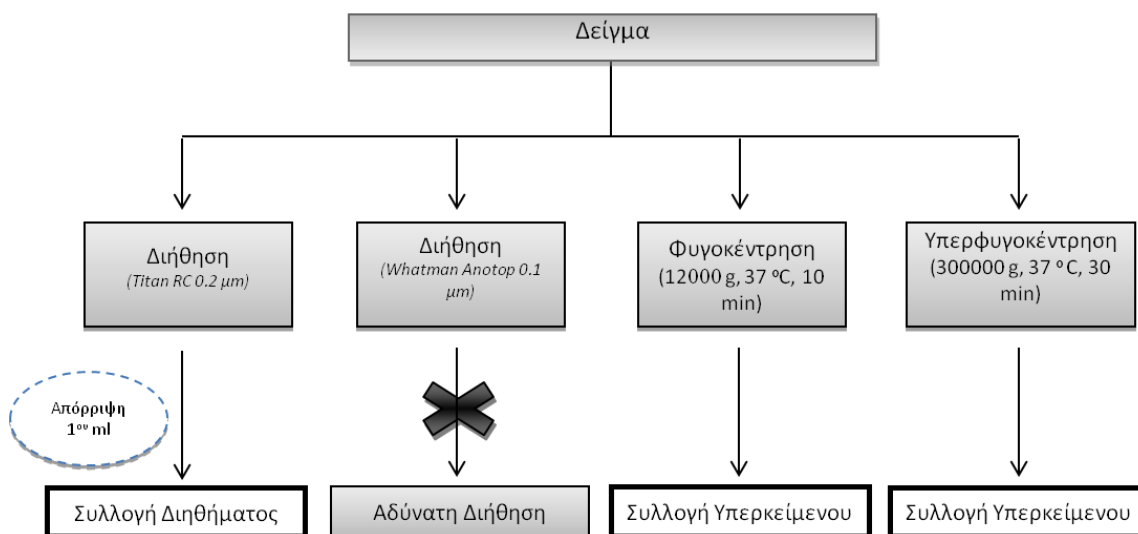
* ΔΜ: δεν μετρήθηκε λόγω αδύνατης διήθησης.



Σχήμα Π.8.2.3: Χειρισμός δειγμάτων δραστικής ουσίας A-Intermediate σε FaSSIF.

Πίνακας Π.8.2.3: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής ουσίας A-Intermediate μετά από διήθηση, φυγοκέντρωση και υπερφυγοκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περισσειας σε FaSSIF στους 37 °C.

Διαδικασία	Δείγμα	Συγκέντρωση (μg/ml)
Διήθηση (Whatman Anotop 0,1 μm)	#1	22,26
	#2	21,41
Διήθηση (Titan RC 0,2 μm)	#1	23,80
	#2	23,79
	#3	23,91
Φυγοκέντρωση (12000 g, 37 °C, 10 min)	#1	24,96
	#2	25,31
	#3	24,57
Υπερφυγοκέντρωση (300000 g, 37°C, 30 min)	#1	23,70
	#2	23,50
	#3	23,45



Σχήμα Π.8.2.4: Χειρισμός δειγμάτων δραστικής ουσίας A-Intermediate σε HIF_{fasted}.

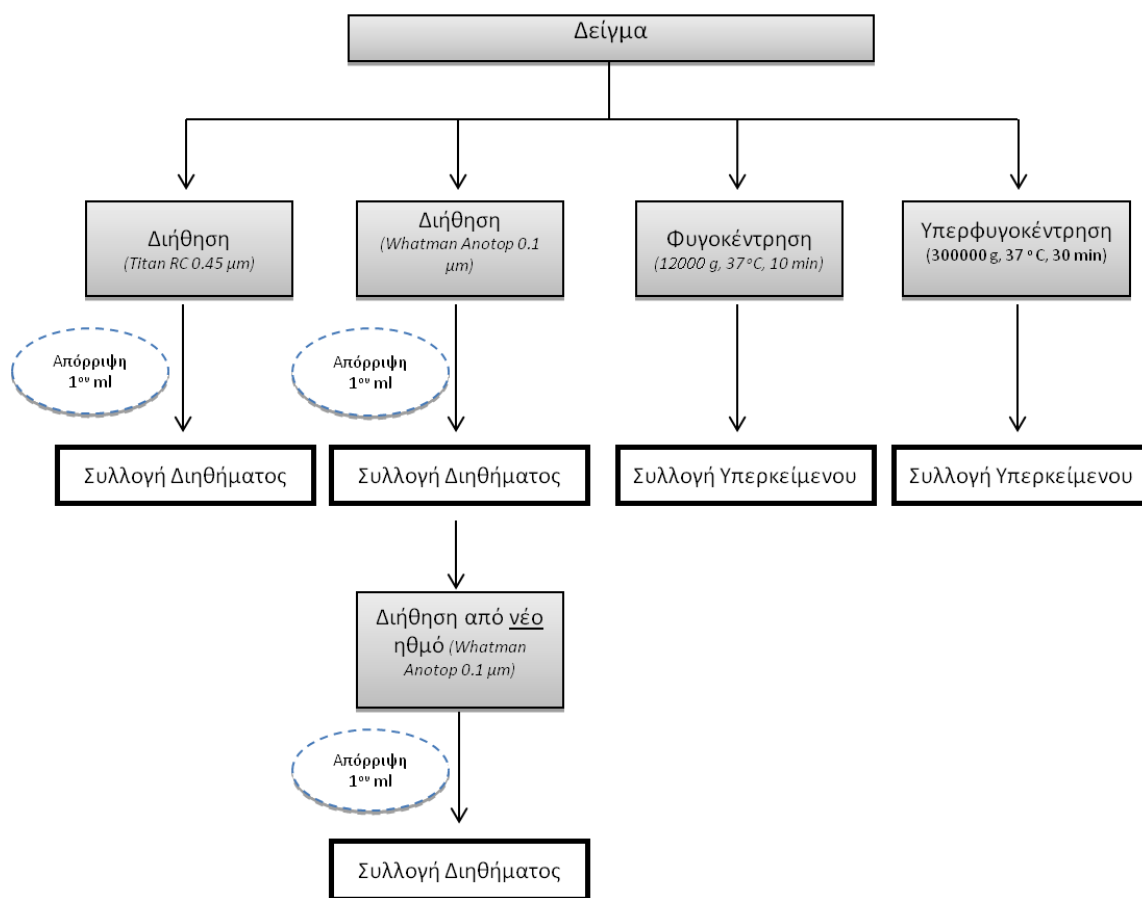
Πίνακας Π.8.2.4: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής ουσίας A-Intermediate μετά από διήθηση, φυγοκέντρωση και υπερφυγοκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περισσειας σε HIF_{fasted} στους 37 °C.

Διαδικασία	Δείγμα	Συγκέντρωση (μg/ml)
Διήθηση (Whatman Anotop 0,1 μm)	#1	ΔΜ
Διήθηση (Titan RC 0,2 μm)	#1	15,20
Φυγοκέντρωση (12000 g, 37 °C, 10 min)	#1	15,17
	#2	15,28
	#3	15,21
Υπερφυγοκέντρωση (300000 g, 37 °C, 30 min)	#1	16,55
	#2	16,55
	#3	16,43

* ΔΜ: δεν μετρήθηκε λόγω αδύνατης διήθησης.

Π.8.3 Χειρισμός δραστικής ουσίας B

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και για την δραστική ουσία A. Όμως, οι διηθήσεις έγιναν από ηθμούς Anotop 0,1 μm (2 φορές για να εκτιμηθεί και το ποσοστό προσρόφησης) και Titan RC 0,45 μm (μία φορά γιατί η προσρόφηση είχε προσδιοριστεί με προηγούμενα πειράματα) (Παράρτημα Π.7).



Σχήμα Π.8.3.1: Χειρισμός δειγμάτων δραστικής ουσίας B-API και δραστικής ουσίας B-Intermediate σε FaSSIF.

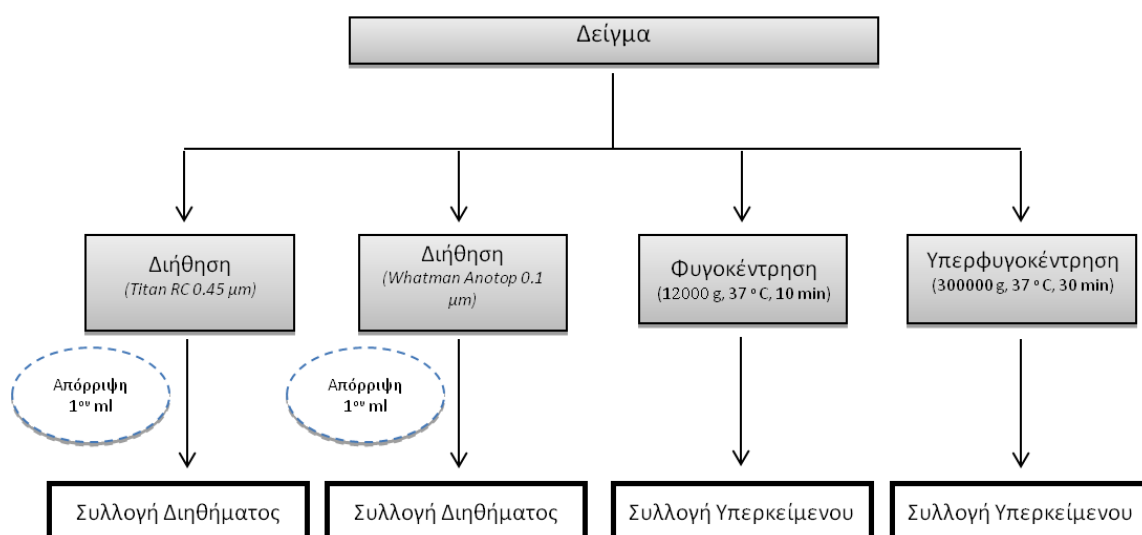
Πίνακας Π.8.3.1: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής ουσίας B-API μετά από διήθηση, φυγοκέντρωση και υπερφυγοκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περισσειας σε FaSSIF στους 37 °C.

Διαδικασία	Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
Διήθηση (<i>Whatman Anotop 0,1 μm</i>)	#1	1 ^η	14,45	-
		2 ^η	ΔΜ	
	#2	1 ^η	14,87	2,1
		2 ^η	14,56	
	#3	1 ^η	14,87	0,7
		2 ^η	14,77	
Διήθηση (<i>Titan RC 0,45 μm</i>)	#1	-	14,56	
	#2	-	15,06	
	#3	-	14,91	
Φυγοκέντρωση (<i>12000 g, 37 °C, 10 min</i>)	#1	-	14,55	
	#2	-	14,36	
	#3	-	14,37	
Υπερφυγοκέντρωση (<i>300000 g, 37 °C, 30 min</i>)	#1	-	11,52	
	#2	-	11,74	
	#3	-	11,82	

* ΔΜ: δεν μετρήθηκε λόγω αδύνατης διήθησης

Πίνακας Π.8.3.2: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής B-Intermediate μετά από διήθηση, φυγοκέντρωση και υπερφυγοκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περισσειας σε FaSSIF στους 37 °C.

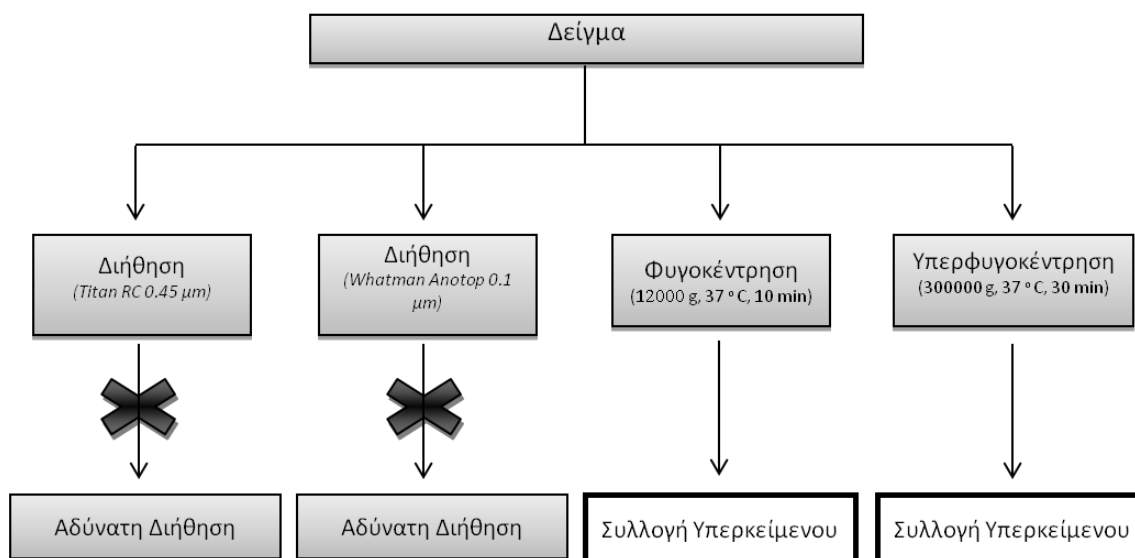
Διαδικασία	Δείγμα	Διήθηση	Συγκέντρωση (μg/ml)	Προσρόφηση %
Διήθηση (Whatman Anotop 0,1 μm)	#1	1 ^η	18,82	1,8
		2 ^η	18,48	
	#2	1 ^η	19,44	5,5
		2 ^η	18,37	
	#3	1 ^η	18,50	1,8
		2 ^η	18,16	
Διήθηση (Titan RC 0,45 μm)	#1	-	23,34	
	#2	-	23,36	
	#3	-	29,00	
Φυγοκέντρωση (12000 g, 37 °C, 10 min)	#1	-	43,27	
	#2	-	34,20	
	#3	-	34,35	
Υπερφυγοκέντρωση (300000 g, 37 °C, 30 min)	#1	-	18,75	
	#2	-	18,83	
	#3	-	19,19	



Σχήμα Π.8.3.2: Χειρισμός δειγμάτων δραστικής ουσίας B-API σε HIF_{fasted}.

Πίνακας Π.8.3.3: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής ουσίας B-API μετά από διήθηση, φυγοκέντρηση και υπερφυγοκέντρηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περισσειας σε HIF_{fasted} στους 37 °C.

Διαδικασία	Δείγμα	Συγκέντρωση (μg/ml)
Διήθηση (Whatman Anotop 0,1 μm)	#1	3,88
Διήθηση (Titan RC 0,45 μm)	#1	8,09
Φυγοκέντρηση (12000 g, 37 °C, 10 min)	#1	6,87
	#2	6,44
	#3	6,37
Υπερφυγοκέντρηση (300000 g, 37 °C, 30 min)	#1	6,43
	#2	6,24
	#3	6,27



Σχήμα Π.8.3.2: Χειρισμός δειγμάτων δραστικής ουσίας B-Intermediate σε HIF_{fasted}

Πίνακας Π.8.3.4: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής ουσίας B-Intermediate μετά από διήθηση, φυγοκέντρωση και υπερφυγοκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ~18 h μετά από ανακίνηση περισσειας σε HIF_{fasted} στους 37 °C.

Διαδικασία	Δείγμα	Συγκέντρωση (μg/ml)
Διήθηση (Whatman Anotop 0,1 μm)	ΔΜ	ΔΜ
Διήθηση (Titan RC 0,45 μm)	ΔΜ	ΔΜ
Φυγοκέντρωση (12000 g, 37 °C, 10 min)	#1	63,75
	#2	65,60
	#3	64,24
Υπερφυγοκέντρωση (300000 g, 37 °C, 30 min)	#1	12,97
	#2	13,12
	#3	13,04

*ΔΜ : δεν μετρήθηκε λόγω αδύνατης διήθησης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9

Μελέτη χρόνου εξισορρόπησης διαλυτότητας

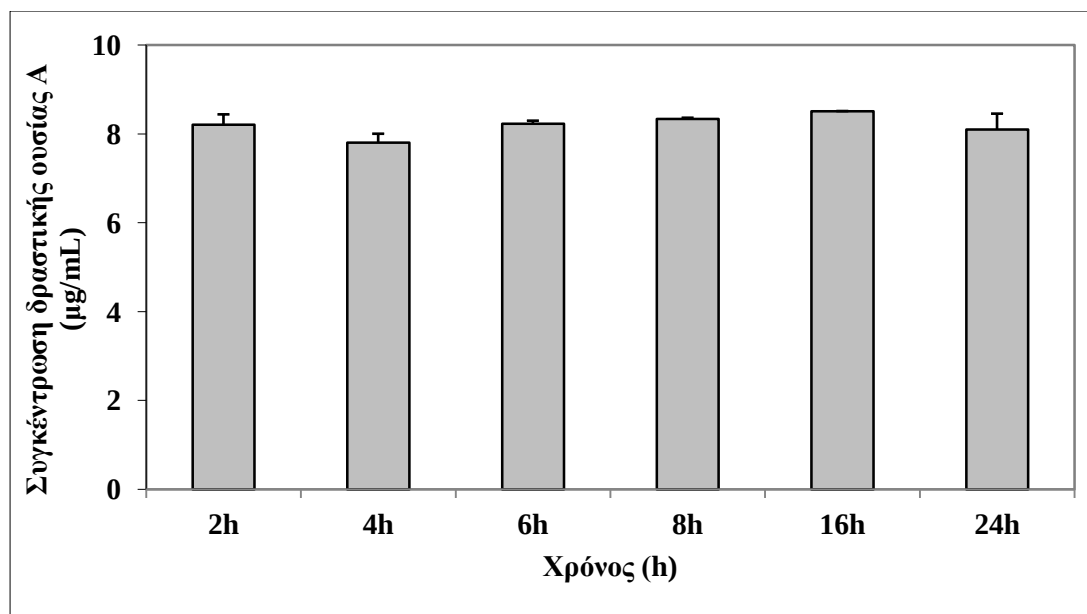
Π.9.1 Εύρεση του χρόνου εξισορρόπησης για τη μέτρηση της διαλυτότητας κορεσμού της δραστικής ουσίας A σε FaSSIF.

Σε 18 σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια των 4 ml, τοποθετείται περίσσεια δραστικής ουσίας A (3 mg) σε 3 ml FaSSIF. Τα φιαλίδια μεταφέρονται σε ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (37 °C, 75 rpm), και ανά τρία, εξέρχονται σε συγκεκριμένους χρόνους (2, 4, 6, 8, 12 και 24 ώρες). Το περιεχόμενο από κάθε φιαλίδιο μεταφέρεται σε γυάλινη σύριγγα των 5 ml με προσαρμοσμένο ηθμό στο άκρο της και ακολουθεί διήθηση. Το 1^ο ml απορρίπτεται για κορεσμό του ηθμού. Ποσότητα 200 μl από το διήθημα αραιώνεται με 800 μl κινητής φάσης και ενίεται στην HPLC για προσδιορισμό της συγκέντρωσής του. Τέλος, με τη βοήθεια πεχαμέτρου μετρήθηκε το pH των διηθημάτων που παρέμειναν στους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Με βάσει τα δεδομένα του Πίνακα Π.9.1 και του Σχήματος Π.9.1, μπορεί να θεωρηθεί ως βέλτιστος χρόνος εξισορρόπησης της διαλυτότητας οι 8-24 ώρες.

Πίνακας Π.9.1: Συγκέντρωση (μg/ml) της δραστικής ουσίας A μετά από ανακίνηση περίσσειας σε FaSSIF στους 37 °C.

Χρόνος (h)	Μέσος ± SD	pH
2	8,21 ± 0,23	6,50
4	7,80 ± 0,20	6,51
6	8,230 ± 0,068	6,52
8	8,336 ± 0,028	6,52
16	8,5075 ± 0,0071	6,52
24	8,10 ± 0,36	6,53



Σχήμα Π.9.1: Μέση τιμή $\pm$ Τυπική απόκλιση για τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας A μετά από ανακίνηση περισσειας σε FaSSIF στους 37 °C.

Π.9.2 Εύρεση του χρόνου εξισορρόπησης για τη μέτρηση της διαλυτότητας κορεσμού της δραστικής ουσίας B σε FaSSIF.

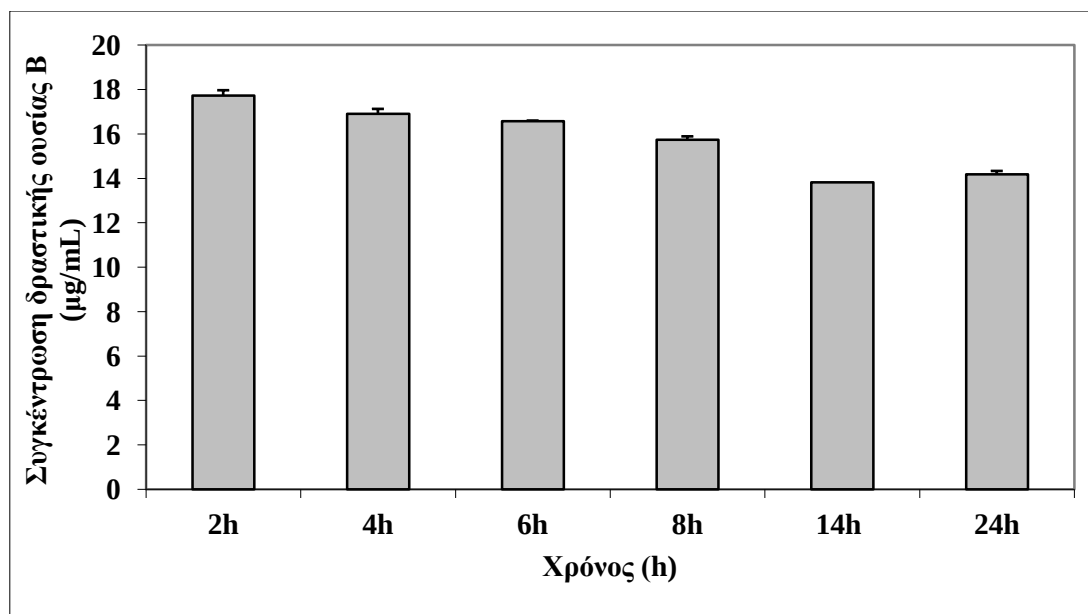
Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθείται και για την εύρεση του βέλτιστου χρόνου εξισορρόπησης για τη μέτρηση της διαλυτότητας της δραστικής ουσίας B.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα Π.9.2 και διαγραμματικά, στο Σχήμα Π.9.2

Πίνακας Π.9.2: Συγκέντρωση (μg/ml) της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας B μετά από ανακίνηση περισσειας σε FaSSIF στους 37 °C.

Χρόνος (h)	Μέσος $\pm$ SD	pH
2	17,72 $\pm$ 0,24	6,38
4	16,90 $\pm$ 0,22	6,38
6	16,577 $\pm$ 0,024	6,36
8	15,74 $\pm$ 0,15	6,40
*14	13,818	-
24	14,17 $\pm$ 0,16	6,37

*Λόγω αστοχίας χειρισμών, στις 14 ώρες έχουμε μόνο μία μέτρηση, με αποτέλεσμα να μην έχουμε τιμή SD και pH.



Σχήμα Π.9.2: Μέση τιμή $\pm$ Τυπική απόκλιση για τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας B μετά από ανακίνηση περίσσειας σε FaSSIF στους 37 °C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10

*Πρωτογενή δεδομένα δειγμάτων που συλλέχθηκαν από το
δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα της διάταξης “20-30 min one-step” στα 25
λεπτά*

Πίνακας Π.10.1: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα πιογλιταζόνης ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με διάλυμα προσομοίωσης (FaSSIF) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	20,90	16,64
	#2	19,65	16,37
	#3	20,45	16,03
	Μέση Τιμή	20,33	16,35
	Τυπική Απόκλιση	0,63	0,31

Πίνακας Π.10.2: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα πιογλιταζόνης ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με αναρροφηθέντα ανθρώπινα εντερικά υγρά (HIF_{fasted}) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	16,77	15,67
	#2	16,82	15,48
	#3	21,33	19,22
	Μέση Τιμή	18,3	16,8
	Τυπική Αποκλιση	2,6	2,1

Πίνακας Π.10.3: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας Α (δόση 12 mg) ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με διάλυμα προσομοίωσης (FaSSIF) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	9,73	9,49
	#2	9,50	9,33
	#3	7,70	7,64
	Μέση Τιμή	9,0	8,8
	Τυπική Αποκλιση	1,1	1,0

Πίνακας Π.10.4: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας A (δόση 12 mg) ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με αναρροφηθέντα ανθρώπινα εντερικά υγρά (HIF_{fasted}) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	2,91	2,88
	#2	6,85	6,73
	#3	9,65	9,57
	Μέση Τιμή	6,5	6,4
	Τυπική Αποκλιση	3,4	3,3

Πίνακας Π.10.5: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας A (δόση 150 mg) ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με διάλυμα προσομοίωσης (FaSSIF) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	103,57	98,50
	#2	108,44	90,94
	#3	97,70	85,77
	Μέση Τιμή	103,2	91,7
	Τυπική Αποκλιση	5,4	6,4

Πίνακας Π.10.6: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας A (δόση 150 mg) ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με αναρροφηθέντα ανθρώπινα εντερικά υγρά (HIF_{fasted}) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	96,19	91,93
	#2	84,49	81,07
	#3	86,70	82,05
	Μέση Τιμή	89,1	85,0
	Τυπική Αποκλιση	6,2	6,0

Πίνακας Π.10.7: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας B (δόση 10 mg) ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με διάλυμα προσομοίωσης (FaSSIF) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	14,91	14,79
	#2	17,15	16,74
	#3	16,79	16,82
	Μέση Τιμή	16,3	16,1
	Τυπική Αποκλίση	1,2	1,1

Πίνακας Π.10.8: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας B (δόση 10 mg) ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με αναρροφηθέντα ανθρώπινα εντερικά υγρά (HIF_{fasted}) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	12,02	10,91
	#2	12,43	11,68
	#3	12,24	11,83
	Μέση Τιμή	12,23	11,48
	Τυπική Αποκλίση	0,21	0,49

Πίνακας Π.10.9: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας B (δόση 50 mg) ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με διάλυμα προσομοίωσης (FaSSIF) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	57,39	25,19
	#2	64,46	22,37
	#3	65,49	22,19
	Μέση Τιμή	62,4	23,2
	Τυπική Αποκλίση	4,4	1,7

Πίνακας Π.10.10: Συνολική και διαλυμένη ποσότητα δραστικής ουσίας Β (δόση 50 mg) ανά όγκο (μg/ml) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, στα 25 λεπτά, με αναρροφηθέντα ανθρώπινα εντερικά υγρά (HIF_{fasted}) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Χρόνος (min)	Πείραμα	Συνολική Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)	Διαλυμένη Ποσότητα Ουσίας (μg/ml)
25	#1	64,62	33,60
	#2	72,88	29,13
	#3	60,80	32,11
	Μέση Τιμή	66,1	31,6
	Τυπική Αποκλιση	6,2	2,3

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11

*Πρωτογενή δεδομένα από τον έλεγχο κατανομής μεγέθους σωματιδίων για
την ουσία δραστική ουσία Β*

Πίνακας Π.11.1: Συνολική ποσότητα (μg/ml) δραστικής ουσίας Β στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα χωρίς διήθηση και μετά από διήθηση από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm (Millipore, Merck), 0,45 μm (Titan RC) και 0,1 μm (Whatman, Anotop) για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, σε πείραμα με την διάταξη BioGIT, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα χορηγείται δόση 10 mg.

Χρόνος	Πείραμα	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διήθηση από 1 μm (μg/ml)	Διήθηση από 0,45 μm (μg/ml) ^α	Διήθηση από 0,45 μm (μg/ml) ^β	Διήθηση από 0,1 μm (μg/ml)
(min)		(χωρίς διήθηση)	(Millipore, Merck)	(Titan RC)	(Titan RC)	(Whatman, Anotop)
5	#1	10,75	9,14	9,29	10,43	10,58
	#2	10,39	7,51	7,46	9,83	9,71
	#3	8,90	7,13	7,04	8,54	8,43
	Μέση τιμή	10,01	7,9	7,9	9,60	9,6
	SD	0,98	1,1	1,2	0,96	1,1
15	#1	19,93	15,40	15,31	19,90	19,77
	#2	20,96	15,33	15,11	20,90	20,99
	#3	18,32	14,65	14,53	18,43	18,73
	Μέση τιμή	19,7	15,13	14,98	19,7	19,8
	SD	1,3	0,41	0,41	1,2	1,1
25	#1	14,49	9,86	9,80	14,39	14,07
	#2	16,39	13,09	12,95	16,19	16,35
	#3	17,82	13,53	13,32	17,95	17,77
	Μέση τιμή	16,2	12,2	12,0	16,2	16,1
	SD	1,7	2,0	1,9	1,8	1,9
35	#1	8,94	6,92	6,82	8,76	8,76
	#2	10,37	8,05	7,96	10,29	10,28
	#3	12,73	9,59	9,33	12,92	12,84
	Μέση τιμή	10,7	8,2	8,0	10,7	10,6
	SD	1,9	1,3	8,4	2,1	2,1
45 ^γ	#1	-	-	-	-	-
	#2	5,91	4,75	4,43	5,91	5,92
	#3	7,92	6,51	6,53	8,01	8,07
	Μέση τιμή	6,9	5,6	5,5	7,0	7,0
	SD	1,4	1,2	1,5	1,5	1,5

^α Διηθείται το διήθημα από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm.

^β Διηθείται δείγμα το οποίο δεν έχει υποστεί καμία προηγούμενη επεξεργασία.

^γ n=2 λόγω υπερβολικής μείωσης όγκο γαστρικού διαμερίσματος μετά τα 40 λεπτά στο 1^ο πείραμα.

Πίνακας Π.11.2: Συνολική ποσότητα (μg/ml) δραστικής ουσίας Β στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα χωρίς διήθηση και μετά από διήθηση από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm (Millipore, Merck), 0,45 μm (Titan RC) και 0,1 μm (Whatman, Anotop) για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, σε πείραμα με την διάταξη BioGIT, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα χορηγείται δόση 50 mg.

Χρόνος	Πείραμα	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διήθηση από 1 μm (μg/ml)	Διήθηση από 0,45 μm (μg/ml) ^α	Διήθηση από 0,45 μm (μg/ml) ^β	Διήθηση από 0,1 μm (μg/ml)
(min)		(χωρίς διήθηση)	(Millipore, Merck)	(Titan RC)	(Titan RC)	(Whatman, Anotop)
5	#1	38,05	29,16	28,49	34,32	30,18
	#2	36,41	30,02	28,86	35,02	25,87
	#3	35,35	26,17	27,51	31,33	29,61
	Μέση τιμή	36,6	28,4	28,28	34	28,5
	SD	1,4	2,0	0,70	2,0	2,3
15	#1	97,79	71,86	40,72	27,17	26,56
	#2	90,32	68,55	41,87	23,98	24,03
	#3	93,71	74,27	42,48	24,66	24,63
	Μέση τιμή	93,9	71,6	41,69	25,3	25,1
	SD	3,7	2,9	0,90	1,7	1,3
25	#1	84,67	62,43	37,91	70,04	23,85
	#2	78,39	58,76	34,58	24,41	23,80
	#3	89,29	64,88	42,45	24,58	24,84
	Μέση τιμή	84,1	62,0	38,3	40	24,16
	SD	5,5	3,1	3,9	26	0,59
35	#1	58,25	46,38	33,72	27,39	25,29
	#2	58,32	48,22	36,10	33,32	24,67
	#3	61,70	50,61	37,87	24,33	24,20
	Μέση τιμή	59,4	48,4	36	28	24,72
	SD	2,0	2,1	37	29	0,55
45	#1	36,70	32,07	28,95	32,15	20,77
	#2	37,13	30,78	28,34	34,39	23,07
	#3	38,76	32,14	29,34	35,31	22,84
	Μέση τιμή	37,5	31,66	28,88	33,9	22,2
	SD	1,1	0,77	0,50	1,6	1,3

^α Διηθείται το διήθημα από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm.

^β Διηθείται δείγμα το οποίο δεν έχει υποστεί καμία προηγούμενη επεξεργασία.

Πίνακας Π.11.3: Συνολική ποσότητα (μg/ml) δραστικής ουσίας Β στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα χωρίς διήθηση και μετά από διήθηση από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm (Millipore, Merck), 0,45 μm (Titan RC) και 0,1 μm (Whatman, Anotop) στα 25 λεπτά σε πείραμα με τη διάταξη “20-30 min one-step”, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα χορηγείται δόση 10 mg.

Μέσο	Πείραμα	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διήθηση από 1 μm (μg/ml)	Διήθηση από 0,45 μm (μg/ml) ^α	Διήθηση από 0,45 μm (μg/ml) ^β	Διήθηση από 0,1 μm (μg/ml)
		(χωρίς διήθηση)	(Millipore, Merck)	(Titan RC)	(Titan RC)	(Whatman, Anotop)
FaSSIF	#1	14,91	10,60	10,36	14,81	14,79
	#2	17,15	11,83	11,09	16,78	16,74
	#3	16,79	14,95	13,18	16,89	16,82
	Μέση τιμή	16,3	12,5	11,5	16,2	16,1
	SD	1,2	2,2	1,5	1,2	1,1
HIF_{fasted}	#1	12,02	11,96	11,80	11,48	10,91
	#2	12,43	12,42	12,06	12,01	11,68
	#3	12,24	12,30	12,10	12,10	11,83
	Μέση τιμή	12,23	12,23	11,99	11,87	11,48
	SD	0,21	0,24	0,16	0,33	0,49

^α Διηθείται το διήθημα από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm.

^β Διηθείται δείγμα το οποίο δεν έχει υποστεί καμία προηγούμενη επεξεργασία.

Πίνακας Π.11.4: Συνολική ποσότητα (μg/ml) δραστικής ουσίας Β στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα χωρίς διήθηση και μετά από διήθηση από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm (Millipore, Merck), 0,45 μm (Titan RC) και 0,1 μm (Whatman, Anotop) στα 25 λεπτά σε πείραμα με τη διάταξη “20-30 min one-step”, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα χορηγείται δόση 50 mg.

Μέσο	Πείραμα	Συνολική ποσότητα ανά όγκο (μg/ml)	Διήθηση από 1 μm (μg/ml)	Διήθηση από 0,45 μm (μg/ml) ^α	Διήθηση από 0,45 μm (μg/ml) ^β	Διήθηση από 0,1 μm (μg/ml)
		(χωρίς διήθηση)	(Millipore, Merck)	(Titan RC)	(Titan RC)	(Whatman, Anotop)
FaSSIF	#1	57,39	48,77	40,61	49,93	25,19
	#2	64,46	55,83	47,60	54,70	22,37
	#3	65,49	59,17	46,42	53,66	22,19
	Μέση τιμή	62,4	54,6	44,9	52,8	23,2
	SD	4,4	5,3	3,7	2,5	1,7
HIF_{fasted}	#1	64,62	60,88	55,78	52,70	25,19
	#2	72,88	65,92	59,93	46,00	22,37
	#3	60,80	60,84	54,48	50,44	22,19
	Μέση τιμή	66,1	62,5	56,7	49,7	23,2
	SD	6,2	2,9	2,8	3,4	1,7

^α Διηθείται το διήθημα από ηθμούς μεγέθους πόρων 1 μm.

^β Διηθείται δείγμα το οποίο δεν έχει υποστεί καμία προηγούμενη επεξεργασία.