



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

*Διδακτορική Διατριβή*

*In vivo και in vitro εκτίμηση της καθίζησης λιπόφιλων ασθενών  
βάσεων και του υπερκορεσμού των περιεχομένων του αυλού του  
λεπτού εντέρου υγιών ενηλίκων*

Ψαχούλιας Δημήτριος

Φαρμακοποιός

ΑΘΗΝΑ 2012

*In vivo και in vitro εκτίμηση της καθίζησης λιπόφιλων ασθενών βάσεων  
και του υπερκορεσμού των περιεχομένων του αυλού του λεπτού εντέρου  
υγιών ενηλίκων*

Όνοματεπώνυμο υποψήφιου διδάκτορα: Ψαχούλιας Δημήτριος

Τριμελής επιτροπή παρακολούθησης της Διατριβής:

Χρήστος Ρέππας (Επιβλέπων), Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.

Μιχαήλ Κουμπάρης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

Μοίρα Συμιλλίδου, Επ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Υπόλοιπα μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Παναγιώτης Μαχαίρας, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.

Γεωργία Βαλσαμή, Επ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Δημήτριος Φατούρος, Επ. Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ.

Σπήλιος Μανωλακόπουλος, Επ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Ε.Κ.Π.Α.



# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΨΑΧΟΥΛΙΑΣ

Ημερομηνία Γέννησης 21.01.1981  
Τόπος Γέννησης Αθήνα, Ελλάδα  
Οικογενειακή Κατάσταση Άγαμος  
Διεύθυνση Ηπείρου 56,  
Κ. Χαλάνδρι, Ελλάδα  
Τηλ. +30 693 76 33 428  
E-mail dpsachoulias@pharm.uoa.gr και  
dpsahoulias@pharmanel.gr



### Εκπαίδευση

2007 **MSc στο Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε.) στη Βιομηχανική Φαρμακευτική** (Βαθμός “Άριστα”)

Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: *Διακυμάνσεις της διαλυτότητας φαρμάκων στα περιεχόμενα του γαστρεντερικού αυλού και χρησιμότητα των προσομοιωμένων μέσων.*

2005 **Άδεια Άσκησης Επαγγέλματος Φαρμακοποιού** (Ελλάδα)

2005 **Πτυχίο Φαρμακευτικής** (Βαθμός “Λίαν Καλώς”)

Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Τίτλος Πτυχιακής Εργασίας: *Διαλυτότητα κορεσμού σε γαστρικό υγρό ανθρώπου και σκύλου: Μια αποκλειστικά pH-εξαρτώμενη παράμετρος;*

1998 **Απολυτήριο Λυκείου** [Βαθμός “Άριστα” (19.1/20)]

41<sup>ο</sup> Γενικό Λύκειο Αθηνών, Ελλάδα

### Επαγγελματική Εμπειρία

Μάρτιος 2012-σήμερα	Βοηθός του πιστοποιημένου για τον Ευρωπαϊκό Οικονομικό Χώρο ατόμου για φαρμακοεπαγρύπνηση της φαρμακευτικής εταιρίας Φαρμανέλ Εμπορική Φαρμακευτική Α.Ε.
Ιούνιος 2011-Φεβρουάριος 2012	Φαρμακοποιός στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Ιπποκράτειο”
Ιανουάριος-Ιούνιος 2008	Οπλίτης Φαρμακοποιός στο Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης (Γ.Σ.Ν.Α.) 492 κατά τη διάρκεια της στρατιωτικής θητείας (2007-2008)

### Δημοσιεύσεις μετά από κρίση

1. Vertzoni M, Pastelli E, Psachoulias D, Kalantzi L, Reppas C. Estimation of intragastric solubility of drugs: In what medium? *Pharm. Res.* **24**:909-917 (2007) [Impact Factor 4.456 (2010)].
2. Clarysse S, Psachoulias D, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Duchateau G, Reppas C, Augustijns P. Postprandial changes in solubilizing capacity of human intestinal fluids for BCS class II drugs. *Pharm. Res.* **26**: 1456-1466 (2009) [Impact Factor 4.456 (2010)].
- 3.\* Psachoulias D, Vertzoni M, Goumas K, Kalioras V, 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.* **28**: 3145-3158 (2011) [Impact Factor 4.456 (2010)].
- 4.\* Psachoulias 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. (Submitted to *Pharm. Res* and under minor revision) [Impact Factor 4.456 (2010)].

### **Άλλες δημοσιεύσεις**

1. Παππά Γ, Στάππα Α, Ψαχούλιας Δ. Ιατρική Νανοτεχνολογία. Φαρμακευτικά Χρονικά **12**:60-64 (2006).
- 2.\* Psachoulias D, Reppas C. Thermodynamic versus kinetic drug solubility: Definitions, methods of measurement and importance after oral administration. *Bulletin Technique Fondation Gattefossé* **104**:9-16 (2011).

### **Παρουσίαση Poster**

1. Vertzoni M, Pastelli E, Psachoulias D, Reppas C. Assessment of drug solubility in fasting gastric contents: In what medium? 2<sup>nd</sup> Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation, November 20–23, 2005, Palais des Congrès de Versailles, Versailles, France.
2. Clarysse S, Psachoulias D, Tack J, Reppas C, Augustijns P. Postprandial changes in solubilizing properties of human intestinal fluids. AAPS Annual Meeting, November 11-15, 2007, San Diego, California, USA.
- 3.\* Psachoulias D, Vertzoni M, Goumas K, Kalioras V, Beato S, Butler J, Reppas C. *In vivo* investigation into the supersaturation and precipitation of a weak base in the fasted human small intestine. 2010 FIP PSWC / AAPS Annual Meeting, November 14-18, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.

### **Ομιλίες**

1. Τίτλος ομιλίας: “Precipitation in and supersaturation of contents of the upper small intestine after administration of two weak bases to fasted adults” GSK site, Ware, United Kingdom, GSK PhD day, 1 Απριλίου 2011.
2. Τίτλος ομιλίας: “Μελέτες διαπερατότητας με τη χρήση κυτταρικών σειρών Caco-2” 1<sup>η</sup> Πανελλήνια Συνάντηση Μεταπτυχιακών Φοιτητών στις Φαρμακευτικές Επιστήμες “Από τα φυσικά προϊόντα και τις συνθετικές ενώσεις στην ανάπτυξη φαρμάκων και την κλινική πρακτική”, Παλιό Πανεπιστήμιο, Πλάκα, 8 και 9 Απριλίου 2011.

Οι εργασίες που σημειώνονται με αστερίσκο (\*) αποτελούν τμήματα της παρούσας διατριβής.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ανέκαθεν αναρωτιόμουν αν ο πρόλογος σε ένα πόνημα, είτε επιστημονικό είτε λογοτεχνικό, αφορά περισσότερο το συγγραφέα του πονήματος ή τον αναγνώστη. Κρίνοντας εξ ιδίων τα αλλώτρια θα έλεγα ότι ο πρόλογος είναι η μόνη αληθινή επικοινωνία μεταξύ του συγγραφέα και του αναγνώστη. Είναι το μόνο μέρος του κειμένου, όταν αυτό είναι επιστημονικό, στο οποίο επιτρέπεται ο συγγραφέας-επιστήμονας να διαβεί τα όρια της λογικής και να περάσει στην πλευρά του συναισθήματος, και, όταν το πόνημα είναι λογοτεχνικό, είναι το μόνο σημείο, στο οποίο ο λογοτέχνης παραθέτει τα συναισθήματα και τις σκέψεις του σχετικά με την προσπάθειά του, και κάνει κοινώνό του τον αναγνώστη στον κόπο, που κατέβαλε, για να κάνει τις σκέψεις, τα όνειρα, το θυμό του· κείμενο. Επειδή η παρούσα διατριβή είναι επιστημονικό κείμενο, ας μου επιτρέψει ο αναγνώστης και κριτής, ο πρόλογος της διατριβής να διέπεται από συναισθηματική λογική και λογικό συναίσθημα. Αρχίζουμε...

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής του Τομέα Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Βιοφαρμακευτικής Χρήστου Ρέππα. Νιώθω πανευτυχής (χρησιμοποιώ εν γνώση μου αυτόν τον όρο) που γνώρισα και συνεργάστηκα με έναν επιστήμονα και άνθρωπο (δεν ταυτίζονται πάντα αυτές οι δύο ιδιότητες) με βαθιά γνώση του αντικειμένου του, αλλά και ταυτόχρονη δίψα για καλύτερη και πληρέστερη μελέτη αυτού. Επιτρέψτε μου να μη σταθώ στο επιστημονικό έργο του Δρ. Ρέππα, το οποίο είναι τεράστιο για την ελληνική πραγματικότητα και αυτό μπορεί να το βρεί ο οποιοσδήποτε, αν πληκτρολογήσει το όνομα του Δρ. Ρέππα σε μια μηχανή αναζήτησης, αλλά για τον επιστήμονα, που είχα την τιμή να με επιβλέπει όχι μόνο κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής, αλλά και κατά την πτυχιακή και μεταπτυχιακή εργασία μου. Ο Δρ. Ρέππας είναι πραγματικά δάσκαλος. Διδάσκει με τον τρόπο συμπεριφοράς και τον επαγγελματισμό του, την αγάπη του για το αντικείμενό του, αλλά, κυρίως, με το ήθος του. Κοντά στον Δρ. Ρέππα έμαθα όχι μόνο περί γαστρεντερικού αυλού, διάλυσης, διαλυτότητας, μέσων, που προσομοιώνουν τα περιεχόμενα του γαστρεντερικού αυλού, στατιστικής κ.ά, αλλά, κυρίως, να μην παρασύρομαι από τους διπλανούς μου αναζητώντας την εύκολη λύση, αλλά με τα μέσα, που διαθέτω, να αγωνίζομαι, να λαμβάνω υπόψη μου την κριτική, που μου ασκείται, και να βελτιώνομαι μέρα με τη μέρα. Τελειώνοντας την αναφορά

μου στο πρόσωπο του Δρ. Ρέππα θα ήθελα να τονίσω κάτι, το οποίο όταν πρωτοήρθα στο Τμήμα Φαρμακευτικής ως πρωτοετής φοιτητής δεν περίμενα να το συναντήσω. Αυτό είναι η δημοκρατία. Ο Δρ. Ρέππας, αν και στο επίπεδο του Καθηγητή της Βιοφαρμακευτικής, ποτέ δε μου επέβαλε την άποψή του, αλλά συνδιαλέχτηκε μαζί μου εξηγώντας μου την άποψή του, και μέσα από τη συζήτηση μου λύθηκαν οι διάφορες απορίες είτε πάνω στο αντικείμενο της Βιοφαρμακευτικής είτε σε άλλα θέματα γενικότερου ενδιαφέροντος.

Νιώθω ιδιαίτερα τυχερός, διότι ενώ άλλοι άνθρωποι ολοκληρώνουν τις σπουδές τους, ακόμη και σε επίπεδο διδακτορικής έρευνας, και φεύγουν από το πανεπιστήμιο χωρίς να έχουν συναντήσει κάποιον αξιόλογο επιστήμονα, εγώ δεν είχα μόνο την τύχη να με επιβλέπει ένα «όνομα» (ας μου επιτραπεί αυτός ο αδόκιμος όρος) στο χώρο της Βιοφαρμακευτικής, αλλά και να συνεργαστώ με μια ολοκληρωμένη επιστήμονα με αγάπη και μεράκι για την εκπαίδευση, αλλά και για την εύρυθμη λειτουργία των εργαστηρίων των προπτυχιακών και των μεταπτυχιακών φοιτητών, τη Δρ. Μαρία Βερτζώνη. Είμαι τυχερός, διότι μου μετέδωσε τις γνώσεις της απλόχερα, με έκανε να αγαπήσω το πείραμα, να προσπαθώ να κατανοήσω χωρίς βιασύνη τα αποτελέσματα και να έχω την υπομονή, που χρειάζονται τα πειράματα Βιοφαρμακευτικής.

Η παρούσα διατριβή χρηματοδοτήθηκε από την εταιρεία GlaxoSmithKline, και συγκεκριμένα από το παράρτημά της (Product Development, GlaxoSmithKline), που εδρεύει στο Harlow (Ηνωμένο Βασίλειο) και κατέβαλε το μεγαλύτερο μέρος της χρηματοδότησης και από το παράρτημά της (GlaxoSmithKline S.p.A.), που έδρευε στη Verona (Ιταλία). Στα πλαίσια αυτής της συνεργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. James Butler, που ήταν υπεύθυνος για την όλη επικοινωνία με την εταιρεία και τη συζήτηση επί των επιστημονικών θεμάτων που προέκυπταν κατά τη μελέτη, την κ. Stefania Beato, που εκτέλεσε τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X από σκόνη, η οποία συλλέχτηκε κατά τη διάρκεια της κλινικής μελέτης, και μας βοήθησε να συνειδητοποιήσουμε τα αποτελέσματα, και τον κ. David Busby για την αντίστοιχη ανάλυση σε στερεό, το οποίο συλλέχθηκε κατά τη διάρκεια των *in vitro* πειραμάτων και ακολούθως να βγάλουμε τα αντίστοιχα συμπεράσματα. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την εταιρεία GlaxoSmithKline και τον Δρ. Butler για τη χρηματοδότηση της μετάβασής μου στη Νέα Ορλεάνη το 2010 στα πλαίσια της ετήσιας συνάντησης της αμερικάνικης σύμπραξης επιστημόνων στις Φαρμακευτικές Επιστήμες (American Association of Pharmaceutical Scientists, AAPS), όπου έγινε

παρουσίαση του κλινικού μέρους της διατριβής με τη μορφή αναρτημένης ανακοίνωσης και για τη φιλοξενία τον Απρίλιο του 2011 στο παράρτημα της GlaxoSmithKline στο Ware (Ηνωμένο Βασίλειο), όπου είχα την τιμή να παρουσιάσω μέρος της διατριβής μου στο επιστημονικό προσωπικό της εταιρείας. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω το AAPS για την ταξιδιωτική χορηγία, η οποία διευκόλυνε ακόμη περισσότερο τη μετάβαση και διαμονή μου στην Νέα Ορλεάνη το Νοέμβριο 2010.

Η κλινική μελέτη έγινε στο Γαστρεντερολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου «Κοργιαλένειο-Μπενάκειο-Ε.Ε.Σ.» υπό την ευθύνη του Διευθυντή Δρ. Κωνσταντίνου Γκούμα, τον οποίο και ευχαριστώ για την τεράστια συμβολή του, διότι η κλινική μελέτη γινόταν Σαββατοκύριακα και εφόσον δεν είχε γενική εφημερία το νοσοκομείο χωρίς να επβαρύνεται ο προϋπολογισμός του, αλλά και για το γεγονός ότι με την παρουσία και το επιστημονικό κύρος του ηρεμούσε τους εθελοντές. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Ακτινολόγο-Ακτινοσκόπο κ. Βασίλειο Καλιώρα για τους ίδιους λόγους.

Έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Δρ. Μοίρα Συμιλλίδου για την πολύτιμη βοήθειά και τις συμβουλές της στην προσπάθεια να συνδέσουμε τα *in vitro* αποτελέσματά μας με δεδομένα από πλάσμα και τη Διευθύντρια του Ιδρύματος για Φαρμακευτική Τεχνολογία του Πανεπιστημίου Goethe (Frankfurt am Main, Γερμανία) Δρ. Jennifer Dressman για τις πολύτιμες συμβουλές της, όποτε και αν τις χρειαστήκαμε. Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλος της τριμελούς επιτροπής παρακολούθησης της Διατριβής, Δρ. Μιχάλη Κουμπάρη, για τις παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια της παρουσίασης των αποτελεσμάτων της διατριβής στην τριμελή επιτροπή, οι οποίες λήφθηκαν υπόψη στη συγγραφή της. Θέλω μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου να ευχαριστήσω τους εθελοντές, που έλαβαν μέρος στην κλινική μελέτη, διότι μας εμπιστεύθηκαν και τους εμπιστευθήκαμε, με αποτέλεσμα να ολοκληρωθεί με επιτυχία και έγκαιρα η κλινική μελέτη. Επίσης, ευχαριστώ τον Νικόλαο Κουμανδράκη, MSc, και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Μ.Δ.Ε. «Βιομηχανική Φαρμακευτική» κ. Μαρία Δημοπούλου (επιβλέπουσα καθηγήτρια είναι η κ. Συμιλλίδου), διότι μας βοήθησαν να κατανοήσουμε και να εκτιμήσουμε καλύτερα το νέο μέσο προσομοίωσης των περιεχομένων του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο, που προτείνουμε (FaSSIF-V2plus), και τέλος, ευχαριστώ τον Dr. Bertil

Abrahamsson για τη διαμεσολάβησή του, ώστε να προμηθευτούμε δωρεάν τη σκόνη της δραστικής ουσίας AZD0865 για τα *in vitro* πειράματα.

Επιστρέφοντας στο συναισθηματικό τόνο του προλόγου θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου γιατί σε αυτούς τους δύσκολους από πολλές απόψεις καιρούς με βοήθησαν οικονομικά και ηθικά να κάνω πράξη ένα όνειρο, που είχα παιδιόθεν, να εκπονήσω διδακτορική διατριβή και να την καμαρώνω δίπλα στις δικές τους. Όμως, τίποτα από τα παραπάνω δεν θα είχε συμβεί, αν δεν ήταν στη ζωή μου όλα αυτά τα χρόνια (12) η αρραβωνιαστικιά μου Ντιάνα (Διονυσία) Τράπαλη, η οποία ήταν αυτή που με ώθησε να δηλώσω για πτυχιακή εργασία όταν ήμουν στο πέμπτο έτος των προπτυχιακών σπουδών μου (εγώ ήθελα να δώσω κατατακτήριες εξετάσεις στην Ιατρική), αλλά και μου στάθηκε όλα αυτά τα χρόνια με αυταπάρνηση και υπομονή, διότι όπως μας είπε ο Δρ. Γεώργιος Διγενής σε μια συζήτηση που είχαμε στη Νέα Ορλεάνη το 2010: «Το πείραμα δεν περιμένει εκδρομές ή διασκέδαση. Όταν πρέπει να γίνει, πρέπει να γίνει, ή μπορεί να πάει κάτι στραβά και να καθυστερήσεις, οπότε πρέπει ο/η σύντροφός σου να έχει κατανόηση, διότι μπορεί να χρειαστεί να ακυρώσετε μια συνάντηση κ.λ.π.». Η Ντιάνα είχε και έχει αυτήν την υπομονή και γι' αυτό την ευχαριστώ!

Τελειώνοντας αυτόν το μακροσκελή, αλλά αναγκαίο κατά την άποψή μου, πρόλογο θέλω να παροτρύνω όποιον σκέφτεται να εκπονήσει διδακτορική διατριβή, να το πράξει, διότι σίγουρα θα γίνει καλύτερος επιστήμονας, και αν έχει την τύχη να συνεργαστεί και με καλούς επιστήμονες και ανθρώπους, σίγουρα θα βελτιωθεί και ως άνθρωπος.

Σας ευχαριστώ!

Δημήτρης Ψαχούλιας

Αθήνα, 11 Ιουνίου 2012

Τετάρτη 11 Ιουλίου 2012. 2 ημέρες μετά την παρουσίαση της διδακτορικής διατριβής, με ένα αίσθημα λύπης για τον κύκλο που έκλεισε, αλλά και με προσδοκία για το νέο ταξίδι που με περιμένει στο χώρο της επιστήμης, προσθέτω τις επισημάνσεις της επταμελούς επιτροπής στο κείμενο της διδακτορικής διατριβής. Θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, διότι αγκάλιασαν το πόνημά μου με θέρμη και σεβασμό, και με τις παρατηρήσεις-εισηγήσεις τους συνέβαλαν τα μέγιστα στην καλύτερη διαμόρφωσή του. Εις το επανιδείν!

## ABSTRACT

**Purpose:** To evaluate precipitation in and supersaturation of intestinal contents, after administration of pharmacologically relevant doses of dipyridamole and ketoconazole to twelve fasted healthy adults. To develop an *in vitro* methodology for prediction of concentrations and potential precipitation of highly permeable, lipophilic weak bases in fasted upper small intestine, based on luminal dipyridamole and ketoconazole data. To evaluate the usefulness of the *in vitro* methodology in predicting precipitation in fasted upper small intestine of two highly permeable, lipophilic weak bases under development, AZD0865 and SB705498, based on plasma data.

**Methods:** On two separate days each subject was administered in stomach 240 mL aqueous solutions of two dipyridamole doses (30 mg and 90 mg) and two ketoconazole doses (100 mg and 300 mg). Physicochemical characteristics, total drug content, and drug concentration were measured in individual intestinal contents ( $\leq 7$  mL) aspirated at specific times post-dosing. Drug concentration after incubation ( $37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ ) of the relevant supernatants and equilibrium solubility were also measured. For the *in vitro* experiments, a three-compartment setup was used. Depending on the dosage form administered in the human study, a solution or a suspension was placed in gastric compartment. A solution simulating the luminal environment (FaSSIF-V2plus) was initially placed in duodenal compartment. Concentrated FaSSIF-V2plus was placed in reservoir compartment in order to keep constant the physicochemical characteristics of the solution in the duodenal compartment during the experiment. Total drug content and drug concentration were measured in samples collected at specific time intervals. Also, drug concentration after incubation ( $37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ ) of the relevant filtrates and equilibrium solubility were measured. In both human and *in vitro* studies crystallinity of precipitates was evaluated with X-rays.

**Results:** Intraluminal precipitated fraction was minimal (dipyridamole,  $\leq 7$  %) or limited (ketoconazole,  $\leq 16$  %). Ketoconazole precipitates were mostly amorphous. Depending on dose, intestinal contents with  $\text{pH} > 3.6$  were supersaturated with dipyridamole up to 10 min (low dose) and 30 min (high dose), and with ketoconazole



up to 30 min (low dose) and 50 min (high dose) post-administration. Intestinal contents with pH>5 and concentration of micellar components <5 mM were supersaturated with dipyridamole or ketoconazole but precipitated fraction was significant only for ketoconazole. After incubation, crystalline precipitates were found in almost all samples. Slow precipitation of base and/or precipitation of other phases account for this observation. *In vitro* dipyridamole and ketoconazole concentrations and precipitated fractions adequately reflected luminal data. However, unlike luminal precipitates, *in vitro* ketoconazole precipitates were crystalline. *In vitro* AZD0865 data confirmed previously published human pharmacokinetic data suggesting that absorption rates are not affected by luminal precipitation. *In vitro* SB705498 data predicted that significant luminal precipitation occurs after a 100 mg or 400 mg but not after a 10 mg dose, consistent with human pharmacokinetic data.

**Conclusions:** Intraluminal precipitation of weakly alkaline, lipophilic, slightly soluble, highly permeable drugs may not be substantial. Estimating intestinal supersaturation in regard to free base is inadequate as other phases may precipitate. An *in vitro* methodology for predicting concentrations and potential precipitation of slightly soluble, highly permeable, lipophilic weak bases in fasted upper small intestine was developed and evaluated for its predictability in regard to luminal precipitation in humans.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Η εκτίμηση της καθίζησης και του υπερκορεσμού των περιεχομένων του εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο μετά τη χορήγηση θεραπευτικά σχετικών δόσεων διπυριδαμόλης και κετοκοναζόλης σε 12 υγιείς εθελοντές. Η ανάπτυξη μιας *in vitro* μεθοδολογίας για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων και της πιθανής καθίζησης λιπόφιλων ασθενών βάσεων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο με βάση τα ενδοαυλικά δεδομένα διπυριδαμόλης και κετοκοναζόλης. Η εκτίμηση της χρησιμότητας αυτής της μεθοδολογίας στην πρόβλεψη της ενδοαυλικής καθίζησης στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου δύο υπό ανάπτυξη υψηλής διαπερατότητας, λιπόφιλων ασθενών βάσεων, της AZD0865 και της SB705498, με βάση δεδομένα στο πλάσμα.

**Πειραματικό μέρος:** Σε δυο διαφορετικές ημέρες χορηγήθηκαν στο στόμαχο κάθε εθελοντή 240 mL υδατικών διαλυμάτων δυο δόσεων διπυριδαμόλης (30 mg και 90 mg) και δυο δόσεων κετοκοναζόλης (100 mg και 300 mg). Τα μεμονομένα εντερικά περιεχόμενα ( $\leq 7$  mL), που αναρροφήθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση των διαλυμάτων, χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά και προσδιορίστηκε η συνολική ποσότητα της δραστικής ουσίας ανά mL δείγματος, καθώς, και η συγκέντρωσή της σε αυτό. Επίσης, προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας μετά από επώαση (37°C/48h) του απαλλαγμένου από πιθανά στερεά αναρροφηθέντος δείγματος και η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού στο αντίστοιχο δείγμα. Για τα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιήθηκε μια διάταξη με τρία διαμερίσματα. Ανάλογα με τη φαρμακοτεχνική μορφή, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην *in vivo* μελέτη, στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε ένα διάλυμα ή ένα εναιώρημα. Στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε αρχικά ένα διάλυμα, το οποίο προσομοίωνε τα ενδοαυλικά περιεχόμενα (FaSSIF-V2plus). Στο τρίτο διαμέρισμα (δεξάμενη) τοποθετήθηκε συμπυκνωμένο FaSSIF-V2plus έτσι, ώστε τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του διαλύματος στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα να παραμένουν σταθερά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Παρόμοια με την *in vivo* μελέτη, προσδιορίστηκαν η συνολική ποσότητα της δραστικής ουσίας ανά mL δείγματος, η συγκέντρωσή της σε αυτό, η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας μετά από επώαση (37°C/48h) του απαλλαγμένου από πιθανά στερεά δείγματος και η

θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού στο αντίστοιχο δείγμα. Τόσο στις *in vivo* όσο και στην *in vitro* μελέτες, η δομή του στερεού, που καθίζησε, εκτιμήθηκε με χρήση ακτίνων-X.

**Αποτελέσματα:** Το ενδοαυλικό κλάσμα καθίζησης ήταν ελάχιστο (διπυριδαμόλη,  $\leq 7\%$ ) ή περιορισμένο (κετοκοναζόλη,  $\leq 16\%$ ). Τα ιζήματα της κετοκοναζόλης ήταν, κυρίως, άμορφα. Ανάλογα με τη δόση, τα ενδοαυτικά περιεχόμενα με  $\text{pH} > 3,6$  ήταν υπέρκορα ως προς τη διπυριδαμόλη μέχρι και 10 min (χαμηλή δόση) και 30 min (υψηλή δόση), και ως προς την κετοκοναζόλη μέχρι και 30 min (χαμηλή δόση) και 50 min (υψηλή δόση) μετά από τη χορήγηση. Τα ενδοαυτικά περιεχόμενα με  $\text{pH} > 5$  και συγκέντρωση μικκυλιακών συστατικών  $< 5\text{ mM}$  ήταν υπέρκορα ως προς τη διπυριδαμόλη και την κετοκοναζόλη, αλλά το κλάσμα καθίζησης ήταν σημαντικό μόνο στην περίπτωση της κετοκοναζόλης. Μετά την επώαση, τα ιζήματα είχαν κρυσταλλική δομή σχεδόν σε όλα τα δείγματα. Πιθανόν, η αργή καθίζηση της βάσης ή/και η καθίζηση άλλων φάσεων αποτελούν δυο λόγους για αυτήν την παρατήρηση. Οι *in vitro* συγκεντρώσεις της διπυριδαμόλης και της κετοκοναζόλης και τα κλάσματα καθίζησης ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα ενδοαυτικά δεδομένα. Παρόλα αυτά, αντίθετα με τα ενδοαυτικά ιζήματα, τα ιζήματα κετοκοναζόλης, τα οποία συλλέχτηκαν στα *in vitro* πειράματα, ήταν κρυσταλλικά. Τα *in vitro* AZD0865 δεδομένα επιβεβαίωσαν τα ήδη δημοσιευμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα κλινικών μελετών σε υγιείς εθελοντές, τα οποία καταδεικνύουν, ότι οι ρυθμοί απορρόφησης δεν επηρεάζονται από την ενδοαυτική καθίζηση. Τα *in vitro* SB705498 δεδομένα προέβλεψαν, ότι στατιστικά σημαντική καθίζηση συμβαίνει μετά τη χορήγηση δόσεων 100 mg και 400 mg, αλλά όχι μετά τη χορήγηση δόσης 10 mg, κάτι, το οποίο ήταν σύμφωνο με τα φαρμακοκινητικά δεδομένα κλινικών μελετών σε ανθρώπους.

**Συμπεράσματα:** Η ενδοαυτική καθίζηση των λιπόφιλων, υψηλής διαπερατότητας δραστικών ουσιών με ασθενώς βασικές ιδιότητες, όταν χορηγούνται σε φαρμακολογικά δραστικές δόσεις, ίσως, να μην είναι τόσο σημαντική όσο θεωρείται μέχρι σήμερα. Η εκτίμηση του ενδοαυτικού υπερκορεσμού ως προς την ελεύθερη βάση είναι προβληματική, διότι είναι πιθανή η καθίζηση διαφόρων φάσεων. Αναπτύχθηκε μια *in vitro* μεθοδολογία για την πρόβλεψη των συγκεντρώσεων και της πιθανής καθίζησης στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική

περίοδο λιπόφιλων, υψηλής διαπερατότητας ασθενών βάσεων, η οποία αξιολογήθηκε ως προς τη δυνατότητά της να προβλέπει ενδοαυλική καθίζηση σε ανθρώπους με πολύ καλά αποτελέσματα.

# Περιεχόμενα

A.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
A.1	Ορισμοί	1
A.2	Διαλυτότητα	2
A.2.1	Σημασία της διαλυτότητας στην ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων φαρμάκων	2
A.2.2	Μέθοδοι μέτρησης της διαλυτότητας	4
A.2.3	Σημασία της διαλυτότητας μετά από <i>per os</i> χορήγηση	10
A.2.4	Θερμοδυναμική διαλυτότητα μονόξινων ασθενών βάσεων σε συνάρτηση με το pH	13
A.3	Υπερκορεσμός	22
A.3.1	Συστήματα χορήγησης δραστικών ουσιών που προκαλούν υπερκορεσμό	23
A.3.2	Διαφορές των συστημάτων χορήγησης δραστικών ουσιών, τα οποία προκαλούν υπερκορεσμό, σε σχέση με αυτά που βασίζονται στη διαλυτοποίηση	29
A.3.3	Υπερκορεσμός που προκαλείται από τη διαβάθμιση του pH κατά μήκος του ΓΕ αυλού	29
A.3.4	<i>In vitro</i> μέθοδοι για την εκτίμηση της επίτευξης και διατήρησης υπερκορεσμού	31
A.4	Καθίζηση	34
A.4.1	Εκτίμηση ενδοαυλικών συγκεντρώσεων και πιθανής καθίζησης στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου λιπόφιλων δραστικών ουσιών με ασθενώς αλκαλικές ιδιότητες	35
A.5	Σκοπός της παρούσας μελέτης	43
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
B.1	Υλικά-Όργανα	46
B.2	Δραστικές ουσίες	48

B.3	Αντιδραστήρια	48
B.4	Τεχνικές ανάλυσης	51
B.5	Κλινική μελέτη	51
B.5.1	Παρασκευή χορηγηθέντων διαλυμάτων	52
B.5.2	Εθελοντές	52
B.5.3	Πρωτόκολλο	53
B.5.4	Χειρισμός των αναρροφηθέντων δειγμάτων	55
B.5.5	Ανάλυση των δεδομένων της κλινικής μελέτης	57
B.6	<i>In vitro</i> πειράματα	58
B.6.1	Η <i>in vitro</i> διάταξη	58
B.6.2	Σύσταση γαστρικού διαμερίσματος	62
B.6.3	Μεθοδολογία πραγματοποίησης των <i>in vitro</i> πειραμάτων και ανάλυσης των δεδομένων	65

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Γ.1	Το περιβάλλον στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου μετά τη χορήγηση των διαλυμάτων διπυριδαμόλης και κετοκοναζόλης κατά τη διαπεπτική περίοδο	69
Γ.2	Θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της διπυριδαμόλης και της κετοκοναζόλης στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από το ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου υγιών εθελοντών κατά τη διαπεπτική περίοδο	73
Γ.3	Καθίζηση και υπερκορεσμός των περιεχομένων ενδοαυτικά μετά τη χορήγηση των διαλυμάτων διπυριδαμόλης και κετοκοναζόλης	74
Γ.4	Αναπαραγωγή των ενδοαυτικών συγκεντρώσεων και των κλασμάτων καθίζησης της διπυριδαμόλης με την <i>in vitro</i> διάταξη που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής	80

Γ.5	Αναπαραγωγή των ενδοαυλικών συγκεντρώσεων και των κλασμάτων καθίζησης της κετοκοναζόλης με την <i>in vitro</i> διάταξη που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής	82
Γ.6	Πρόβλεψη της ενδοαυλικής καθίζησης της δραστικής ουσίας AZD0865	86
Γ.7	Πρόβλεψη της ενδοαυλικής καθίζησης της δραστικής ουσίας SB705498	89

## Δ. ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δ.1	Καθίζηση λιπόφιλων ασθενών βάσεων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο	95
Δ.2	Πρόβλεψη της καθίζησης λιπόφιλων βάσεων με <i>in vitro</i> διατάξεις	102

## Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

E.1	Ελληνική βιβλιογραφία	104
E.2	Αγγλική βιβλιογραφία	104

## Παραρτήματα

Παράρτημα 1	Μέθοδοι προσδιορισμού δραστικών ουσιών, χολικών αλάτων, λιπιδίων και ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου των δειγμάτων	123
Παράρτημα 2	Αντίγραφα εγγράφων που αφορούν στην αδειοδότηση και λήξη πραγματοποίησης της κλινικής μελέτης GR210181	148
Παράρτημα 3	Έγγραφα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εθελοντή στη διάρκεια της κλινικής μελέτης	155
Παράρτημα 4	Αντίγραφα ακτινοσκοπικών απεικονίσεων που ελήφθησαν στο τέλος κάθε πειραματικής ημέρας για επιβεβαίωση της θέσης του σωλήνα	173
Παράρτημα 5	Βελτιστοποίηση της διαδικασίας του χειρισμού των αναρροφηθέντων δειγμάτων	180

Παράρτημα 6	Επάρκεια φυγοκέντρωσης για το διαχωρισμό στερεών σωματιδίων από περιεχόμενα του εντερικού αυλού που συλλέχθηκαν κατά τη διαπεπτική περίοδο	183
Παράρτημα 7	Προκαταρκτικά πειράματα για τη βελτιστοποίηση του χειρισμού των δειγμάτων που συλλέγονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα και της <i>in vitro</i> διάταξης	184
Παράρτημα 8	Έλεγχος προσρόφησης της δραστικής ουσίας AZD στους πλαστικούς περιέκτες και στους ηθμούς RC 0,45 μm και έλεγχος σταθερότητάς της σε FaSSIF-V2plus	188
Παράρτημα 9	Έλεγχος προσρόφησης της δραστικής ουσίας SB στους ηθμούς RC 0,45 μm και PTFE 0,45 μm και έλεγχος σταθερότητάς της σε FaSSIF-V2plus	190
Παράρτημα 10	Αναλυτική παρουσίαση των πρωτογενών δεδομένων, των κλασμάτων καθίζησης και των δεικτών υπερκορεσμού που συλλέχθηκαν/υπολογίστηκαν στην παρούσα Διατριβή	192



## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### A.1 Ορισμοί

Διαλυτότητα στη Φαρμακευτική είναι η μέγιστη συγκέντρωση της υπό εξέτασης ουσίας, η οποία μπορεί να επιτευχθεί σε ένα υγρό μέσο (συνήθως υδατικό) σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Ανάλογα με τη μέθοδο μέτρησης, η διαλυτότητα μπορεί να χαρακτηριστεί ως κινητική ή θερμοδυναμική (Hörter et al. 2001, Box et al. 2008).

Ως κινητική διαλυτότητα (kinetic solubility) χαρακτηρίζεται η συγκέντρωση σε ένα υγρό μέσο τη χρονική στιγμή, κατά την οποία εμφανίζεται ίζημα για πρώτη φορά.

Η διαλυτότητα σε ισορροπία (equilibrium solubility) ή θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού (thermodynamic solubility) είναι μια θερμοδυναμική ιδιότητα, η οποία αναφέρεται στη συγκέντρωση κορεσμένου διαλύματος (saturated solution), όταν διαλυμένη ουσία και στερεό είναι σε ισορροπία.

Όταν δεν υπάρχει κανενός είδους αλληλεπίδραση της διαλυμένης ουσίας με παράγοντα του υγρού μέσου, η διαλυτότητα ονομάζεται ενδογενής (intrinsic). Ο όρος διαλυτοποίηση (solubilization) υποδηλώνει την αύξηση της διαλυτότητας λόγω αλληλεπίδρασης των μορίων της διαλυμένης ουσίας με παράγοντα που συνυπάρχει στο διάλυμα. Η διαλυτοποίηση συνήθως πραγματοποιείται με την κατανομή του φαρμάκου στα μικκύλια, με τη συμπολοκοποίησή του με ένα ή περισσότερα μόρια ή ιόντα και με την έγκλειση του φαρμάκου στο εσωτερικού ενός άλλου μορίου.

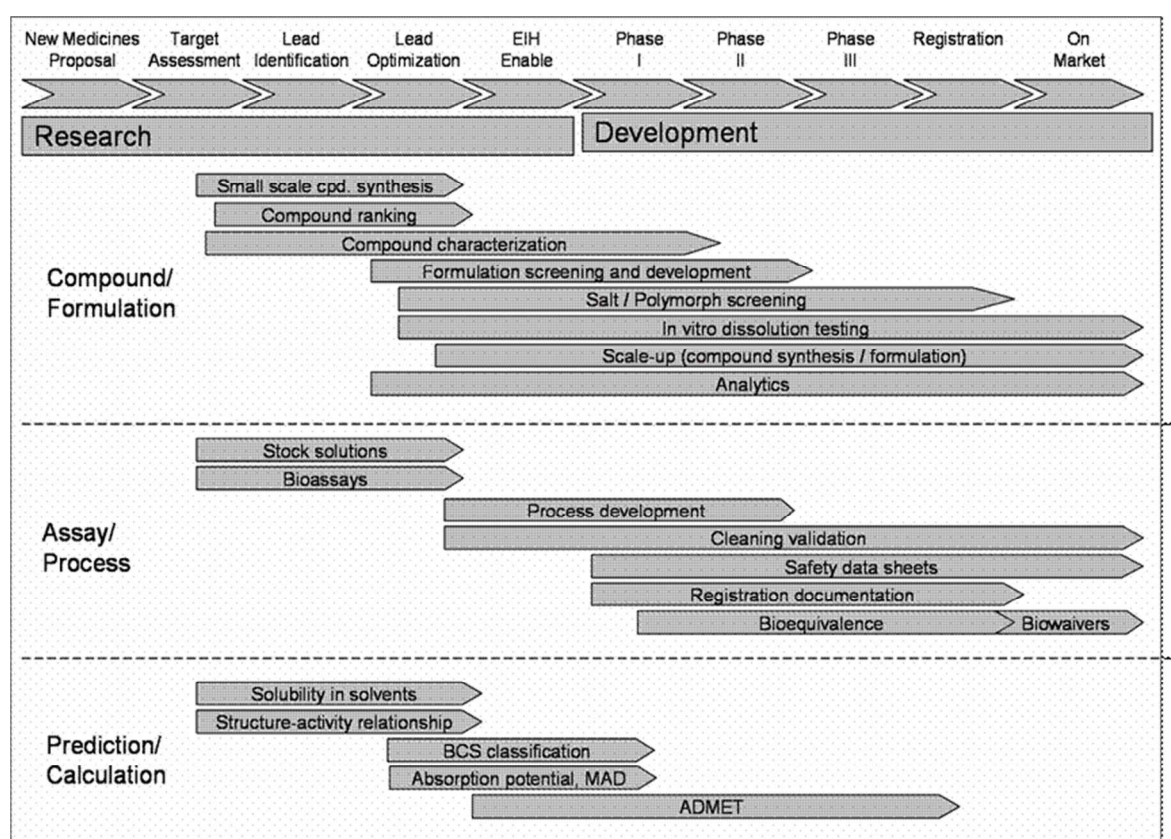
Ένα διάλυμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως ακόρεστο (unsaturated), όταν μπορεί να διαλυθεί σε αυτό και άλλη ποσότητα ουσίας. Ένα διάλυμα χαρακτηρίζεται ως υπέρκορο (supersaturated), όταν περιέχει ποσότητα διαλυμένης ουσίας μεγαλύτερη από αυτή, που απαιτείται για να είναι το διάλυμα κορεσμένο. Προφανώς, ένα διάλυμα μπορεί να είναι υπέρκορο για περιορισμένο χρονικό διάστημα. Υπερκορεσμός μπορεί να συμβεί σε διάφορες περιπτώσεις, όπως όταν η δραστική ουσία κρυσταλλώνει σε διάφορες κρυσταλλικές μορφές ή όταν η δραστική ουσία είναι μορφοποιημένη κατάλληλα, ώστε ο συγχωρηγούμενος φορέας να δίνει τη δυνατότητα να

δημιουργείται υπερκορεσμός [π.χ. ορισμένες λιπιδικές φαρμακοτεχνικές μορφές (Φ/Μ)].

## A.2 Διαλυτότητα

### A.2.1 Σημασία της διαλυτότητας στην ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων φαρμάκων

Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας είναι εξαιρετικής σημασίας για τη φαρμακευτική έρευνα και σχετικές μετρήσεις αποτελούν ρουτίνα τόσο στο στάδιο ανακάλυψης δραστικών ουσιών, όσο και στο στάδιο ανάπτυξης Φ/Μ (Σχήμα A.1).



**Σχήμα A.1:** Η σημασία της διαλυτότητας στην ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων φαρμάκων (Alsenz and Kansy, 2007).

Τα δεδομένα διαλυτότητας είναι χρήσιμα στην ιεράρχηση πιθανώς δραστικών μορίων και στην αξιολόγηση της δραστικότητας νέων μορίων (π.χ. στην κατανόηση

των δεδομένων δόσης-απόκρισης). Στην τελευταία φάση της ανακάλυψης λαμβάνουν χώρα μετρήσεις διαλυτότητας σε διάφορους διαλύτες, οι οποίες βοηθούν στην αναγνώριση της πιο σταθερής κρυσταλλικής μορφής. Σε αυτό το στάδιο η διαλυτότητα καθορίζει την οδό και τη μέθοδο χορήγησης της δραστικής ουσίας. Για παράδειγμα, η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού σε απλά ισοτονικά μέσα είναι κεφαλαιώδους σημασίας, όταν η δραστική ουσία πρόκειται να χορηγηθεί ενδοφλέβια. Στην περίπτωση χορήγησης της δραστικής ουσίας από το στόμα, είναι απαραίτητες και πρόσθετες μετρήσεις διαλυτότητας, ώστε να διερευνηθεί η πιθανότητα επίδρασης της τροφής στην ενδοαυλική συμπεριφορά της δραστικής ουσίας.

Η διαλογή φαρμακολογικά δραστικών ουσιών με τεχνικές υψηλής απόδοσης έχει οδηγήσει στην παρουσία ουσιών στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης που παλιότερα θα απορρίπτονταν ακόμη και στη φάση σχεδιασμού τους, λόγω του εξαιρετικά λιπόφιλου χαρακτήρα τους [χαμηλής υδατοδιαλυτότητας] (Venkatramana et al. 2009). Έχει αναφερθεί ότι οι τιμές διαλυτότητας περίπου του 33 % των δραστικών ουσιών, που βρίσκονταν στο στάδιο ανάπτυξης στο τέλος της τελευταίας δεκαετίας του 20ου αιώνα από την εταιρία Pfizer, δεν ξεπερνούσαν τα 5 µg/mL (Gribbon and Sewing, 2005). Στις φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες που γίνονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης νέου φαρμάκου, είναι επιθυμητό να χρησιμοποιούνται υδατικά διαλύματα δραστικών ουσιών. Επομένως, η χαμηλή θερμοδυναμική υδατοδιαλυτότητα μιας δραστικής ουσίας δυσχεραίνει την πραγματοποίηση αυτών των μελετών. Τέλος, κατά τη διάρκεια ανάπτυξης μιας δραστικής ουσίας, οι μετρήσεις διαλυτότητας είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των ιδιοτήτων της στερεής φάσης και για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς της δραστικής ουσίας στον άνθρωπο (Σχήμα Α.1).

Μετά τη λήψη άδειας κυκλοφορίας, τα δεδομένα διαλυτότητας είναι σημαντικά για τον καθορισμό των απαραίτητων μελετών (*in vivo* ή *in vitro*, Amidon et al. 1995) που απαιτούνται για να διαπιστωθεί αν η εν λόγω Φ/Μ είναι βιοϊσοδύναμη με μια άλλη (Σχήμα Α.1).

### A.2.2 Μέθοδοι μέτρησης της διαλυτότητας

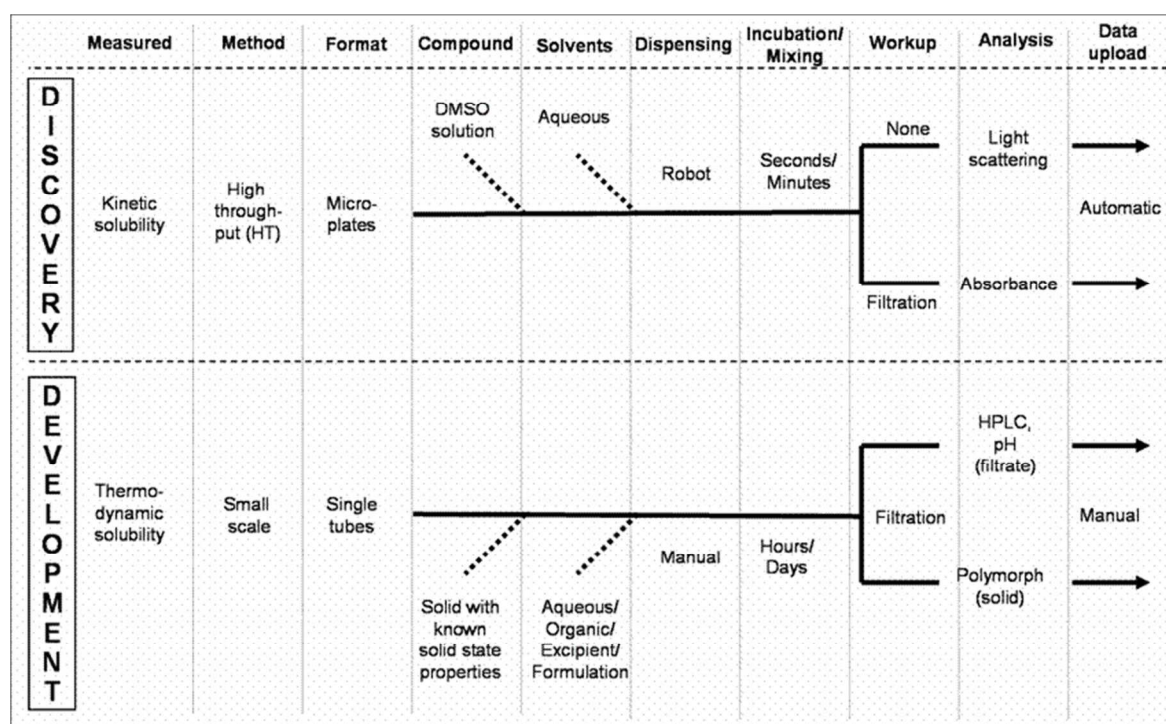
Η γνώση της ακριβούς τιμής διαλυτότητας της υπό μελέτη δραστικής ουσίας είναι πολλές φορές δύσκολη, διότι το αποτέλεσμα επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό πειραματικών μεταβλητών (Deshwal et al. 2006). Η ευαισθησία στις πειραματικές συνθήκες καθιστά την εκτίμηση της διαλυτότητας με βάση θεωρητικούς υπολογισμούς προβληματική και οι τελευταίοι είναι αδύνατο να αντικαταστήσουν πλήρως τις πειραματικές μετρήσεις παρά την εξοικονόμηση χρόνου και κόστους, που προσφέρουν (Venkatrama et al. 2009).

Οι μετρήσεις της διαλυτότητας προϋποθέτουν καθορισμό του τύπου της διαλυτότητας (κινητική ή θερμοδυναμική), του υγρού μέσου και της μεθοδολογίας. Επιπρόσθετα, συνεκτιμώνται η διαθέσιμη ποσότητα και η καθαρότητα της προς μελέτη ουσίας.

Η μέτρηση της κινητικής διαλυτότητας (Σχήμα A.2) είναι γρήγορη και προϋποθέτει διαθεσιμότητα πολύ μικρής ποσότητας (0,4 μmol) της δραστικής ουσίας. Για αυτόν το λόγο, ο προσδιορισμός της κινητικής διαλυτότητας προτιμάται μέχρι τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των φαρμάκων. Η χαμηλή καθαρότητα της ουσίας και η παρουσία του διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) στο μέσο (Σχήμα A.2) αποτελούν μειονεκτήματα. Ακόμη και 1 % v/v DMSO μπορεί να δράσει ως παράγοντας διαλυτοποίησης ή/και να οδηγήσει σε υπερκορεσμό. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορες προτάσεις, οι οποίες έχουν ως στόχο την αντικατάσταση του DMSO ή τουλάχιστον τη μείωση της επίδρασής του (Chen et al. 2002, Sugano et al. 2006).

Σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης μιας δραστικής ουσίας (όταν ο αριθμός των ενώσεων μειώνεται σημαντικά, είναι διαθέσιμες μεγαλύτερες ποσότητες για κάθε ένωση, και μάλιστα αυξημένης καθαρότητας) είναι δυνατός ο προσδιορισμός της θερμοδυναμικής διαλυτότητας κορεσμού. Οι σχετικές μετρήσεις δεν περιλαμβάνουν τη χρήση DMSO, αλλά αυτό δε σημαίνει ότι οι μετρήσεις είναι χωρίς προβλήματα. Ανάλογα με τη δραστική ουσία, τη σύσταση του μέσου και την *in vitro* διάταξη, ο χρόνος εξισορρόπησης μπορεί να ποικίλει από μερικές ώρες μέχρι πολλές ημέρες. Η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης (shake flask method) είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος (Σχήμα A.2). Παρόλα αυτά, είναι κοστοβόρα (Avdeef,

2007) και ο διαχωρισμός του στερεού από το υγρό μέσο μπορεί να αποτελέσει μεγάλο πρόβλημα, ιδίως, όταν το στερεό σε περίσσεια αποτελείται από μικρο- ή νανο-σωματίδια. Άλλα προβλήματα, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τη μέτρηση της θερμοδυναμικής διαλυτότητας είναι η αλλαγή pH στην ισορροπία, στην περίπτωση των ιονιζόμενων δραστικών ουσιών (Avdeef, 2007) και η επίδραση της ποσότητας του στερεού σε περίσσεια, ιδιαίτερα, όταν μετράται η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού ενός άλατος (Serajuddin, 2007). Επιπρόσθετα, οι μετρήσεις θερμοδυναμικής διαλυτότητας απαιτούν προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής της ουσίας στην ισορροπία.



**Σχήμα A.2:** Οι συνηθέστερες μεθοδολογίες για τη μέτρηση της κινητικής και θερμοδυναμικής διαλυτότητας (Alsenz and Kansy, 2007).

Στη Βιομηχανία, ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής μιας ουσίας γίνεται κυρίως με την τεχνική της περίθλασης ακτίνων-X ή/και με φασματοσκοπία Raman. Με την τεχνική περίθλασης ακτίνων-X η σκόνη τοποθετείται στη διάταξη και διαπερνάται από στενή δέσμη ακτίνων-X. Το μήκος κύματος των ακτίνων-X είναι ίδιας τάξης μεγέθους με την απόσταση των μορίων στο κρυσταλλικό πλέγμα, με

αποτέλεσμα το δείγμα να δρά ως φράγμα περίθλασης. Η περίθλαση λαμβάνει χώρα σε γωνίες, που αντιστοιχούν στην εξίσωση Bragg (Munson, 2009):

$$n\lambda=2d\sin\theta \quad (\text{εξ. A.1})$$

όπου  $n$  ένας ακέραιος αριθμός ( $n=1, 2, 3, \dots$ ),  $\lambda$  το μήκος κύματος των ακτίνων- $X$ ,  $d$  η απόσταση μεταξύ παράλληλων επιπέδων στο πλέγμα και  $\theta$  η γωνία μεταξύ της προσπίπτουσας και σκεδασμένης δέσμης ακτίνας- $X$ . Μπορεί να υπάρχουν πολλές κορυφές περίθλασης, καθεμιά από τις οποίες σημειώνεται με μια διαφορετική τιμή του ακέραιου αριθμού  $n$ . Τα δεδομένα αντιστοιχούν σε δακτυλίους μεγαλύτερης και μικρότερης έντασης και απεικονίζεται η ένταση σε σχέση με τη γωνία  $2\theta$  σε μονοδιάστατα χαρακτηριστικά διαγράμματα σκόνης.

Η πυκνότητα των κορυφών σε μια τέτοια απεικόνιση μπορεί να επηρεαστεί από το μέγεθος των σωματιδίων και τη μορφολογία, η οποία, συνήθως αναφέρεται, ως «προτιμώμενος προσανατολισμός» (preferred orientation). Αυτό είναι δυνατό να δυσκολεύει την εξήγηση των δεδομένων. Η απεικόνιση περίθλασης από στερεό άμορφης δομής αντιστοιχεί σε μια ευρεία κορυφή ή κορυφές, που αναφέρονται ως ένα άμορφο φωτοστέφανο (amorphous halo), διότι τα συστήματα άμορφης δομής δεν έχουν καθορισμένη διάταξη [little long-range order] (Munson, 2009). Ωστόσο, η περίθλαση ακτίνων- $X$  από σκόνη αποτελεί τη βασική τεχνική για την ταυτοποίηση μετασταθών δομών των πολύμορφων, διότι είναι πολύ ευαίσθητη στις παραμέτρους του κρυσταλλικού πλέγματος. Είναι δυνατό να καθοριστεί η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή από υψηλής ποιότητας δεδομένα περίθλασης ακτίνων- $X$  από σκόνη με τη χρήση μιας διαδικασίας γνωστή ως βελτίωση Rietveld [Rietveld Refinement] (Munson, 2009).

Η φασματοσκοπία Raman ανήκει στις φασματοσκοπικές τεχνικές εκπομπής. Η φασματοσκοπική διάκριση των διαφορετικών στερεών μορφών ενός συστατικού οφείλεται στις διαφορές της διαμόρφωσης των μορίων, των δεσμών υδρογόνου και άλλων αλληλεπιδράσεων, καθώς και της διάταξης στις κρυσταλλικές και άμορφες δομές. Οι διαφορές στη δομή εμφανίζονται σε ένα φάσμα Raman ως μετατόπιση κορυφών (peak shifts) και διευρύνσεις (broadening) των ζωνών δόνησης. Οι κορυφές είναι, συνήθως, της τάξης των  $1-50 \text{ cm}^{-1}$  και μπορούν να συμβούν σε όλο το εύρος του φάσματος από  $100-3800 \text{ cm}^{-1}$ . Οι κορυφές και οι διευρύνσεις στις ζώνες ταλάντωσης των δεσμών N-H, O-H, και C-H μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ

των διαφορετικών στερεών μορφών, ενώ αυτές των αλειφατικών και αρωματικών των δεσμών C-C παραμένουν σχετικά αμετάβλητες (Chen et al. 2012). Η φασματοσκοπία Raman είναι σχετικά χαμηλού κόστους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί *in situ*. Ένα άλλο πλεονέκτημά της είναι, ότι μπορεί να συνδεθεί με μικροσκόπιο για τη λήψη χημικών πληροφοριών σχετικά με μια μικρή περιοχή του δείγματος. Επιπρόσθετες πληροφορίες μπορεί να ληφθούν με μικροτεμαχισμό (microtoming) του δείγματος (Munson, 2009).

#### Εναλλακτικές μέθοδοι μέτρησης της διαλυτότητας

Στη βιβλιογραφία, έχουν προταθεί εναλλακτικές μέθοδοι μέτρησης της θερμοδυναμικής διαλυτότητας. Ένα γενικό χαρακτηριστικό όλων είναι ότι απαιτείται μικρή ποσότητα στερεού και λίγος χρόνος για τη μέτρηση, αλλά η χρήση τους περιορίζεται από τη δυσκολία του χαρακτηρισμού της δομής του στερεού στην ισορροπία.

Η μέθοδος των Higuchi et al. (1979) βασίζεται στη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης, αλλά περιλαμβάνει τη χρήση μικρού, μη αναμίξιμου με υδατικά μέσα, όγκου οργανικού διαλύτη (περίπου 2 %). Όμως, φαίνεται ότι αυτή η μέθοδος είναι προβληματική για ιονιζόμενα μόρια, καθώς και στην περίπτωση που οι κρύσταλλοι του στερεού σε περίσσεια δεν είναι θερμοδυναμικά σταθεροί (Avdeef, 2007).

Η μικρο-διάταξη διάλυσης [micro dissolution apparatus, (Avdeef, 2007)] είναι χρήσιμη σε περίπτωση που διαλύεται η θερμοδυναμικά σταθερή μορφή. Η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού εκτιμάται από την αρχική απεικόνιση της διάλυσης. Είναι ιδανική μέθοδος όταν είναι διαθέσιμες πολύ μικρές ποσότητες δραστικής ουσίας. Η μέθοδος μπορεί να επιταχυνθεί με τη χρήση οπτικών ινών συνδεδεμένων με UV ανιχνευτή (Avdeef et al. 2007).

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι μικρο-τιτλοδότησης στην ισορροπία. Διακρίνονται σε αυτές που βασίζονται στη χρήση DMSO, και σε αυτές, που δεν προϋποθέτουν τη χρήση DMSO. Στην πρώτη περίπτωση, μετά από περίπου εικοσιτετράωρη επώαση και διαχωρισμό του στερεού με διήθηση ή φυγοκέντρηση, προσδιορίζεται η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της δραστικής ουσίας με μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων στο UV (Avdeef, 2007). Στη δεύτερη

κατηγορία ανήκουν η μέθοδος GeneVac, η μέθοδος PASS με τη χρήση πτητικού μη αναμίξιμου διαλύτη, και η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης σε μικροκλίμακα. Στη μέθοδο GenVac, ο διαλύτης DMSO απομακρύνεται με λυοφιλοποίηση. Στη μέθοδο PASS, χρησιμοποιείται επτάνιο για απαιωρισμό του στερεού και στη συνέχεια ο διαλύτης εξατμίζεται. Στη συνέχεια, και στις δύο μεθόδους (GenVac και PASS) προστίθεται το μέσο, όπου θα προσδιοριστεί η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού, και μετά από περίπου εικοσιτετράωρη επώαση και διαχωρισμό του στερεού από το υγρό μέσο με διήθηση/φυγοκέντρηση, η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στο UV (Avdeef, 2007).

Οι ποτενσιομετρικές μέθοδοι βασίζονται στη μέτρηση της αλλαγής του pH του μέσου, εξαιτίας της διάλυσης της δραστικής ουσίας. Είναι κατάλληλες μόνο για ιονιζόμενα μόρια. Για την εφαρμογή αυτών των μεθόδων δεν απαιτείται η δραστική ουσία να απορροφά στο UV και αποφεύγεται ο διαχωρισμός του στερεού από το διάλυμα. Επίσης, δεν απαιτείται να έχει φτάσει το σύστημα σε θερμοδυναμική ισορροπία [οι μεγάλοι χρόνοι επώασης με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης αποτελούν σημαντικό πρόβλημα (Box et al. 2006)]. Η δημοφιλέστερη ποτενσιομετρική τεχνική είναι η pSol<sup>®</sup> (Avdeef, 2007). Το δείγμα, αφού απαιωρηθεί, τιτλοδοτείται στην κατεύθυνση της διάλυσης και με βάση τις τιμές  $pK_a$  και  $\log P$  γίνεται εκτίμηση της ενδογενούς διαλυτότητας. Πλεονέκτημα είναι ότι απαιτούνται μικρές ποσότητες της ιονιζόμενης δραστικής ουσίας και προσδιορίζεται ολόκληρη η απεικόνιση pH–θερμοδυναμικής διαλυτότητας. Πρόκειται, όμως, για συγκριτικά αργή τεχνική. Με την τεχνική CheqSol<sup>®</sup> επιταχύνεται η εκτίμηση της ενδογενούς διαλυτότητας, αλλά σε αυτήν την περίπτωση γίνεται εκτίμηση κι όχι προσδιορισμός της απεικόνισης pH–θερμοδυναμικής διαλυτότητας (Völgyi et al. 2010). Συνοπτικά, στα πειράματα με τη μέθοδο CheqSol<sup>®</sup> ζυγίζεται ποσότητα δραστικής ουσίας, η οποία τοποθετείται στο ποτήρι τιτλοδότησης, και προστίθενται 10 mL KCl 0,15 M. Αν η δραστική ουσία είναι οξύ, προστίθεται ποσότητα τιτλοδότη-βάση έτσι ώστε το pH του διαλύματος να επιτρέπει στη δραστική ουσία να είναι πλήρως ιοντισμένη. Στην περίπτωση που η δραστική ουσία είναι βάση, προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα τιτλοδότη-οξύ. Στη συνέχεια, προστίθενται μικρές ποσότητες τιτλοδότη προς την κατεύθυνση σχηματισμού της μη ιοντισμένης μορφής της δραστικής ουσίας. Πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι δίνει τη δυνατότητα να διαχωρίζονται οι ιονιζόμενες ουσίες σε αυτές που δημιουργούν και σε αυτές που δε



δημιουργούν υπέρκορα διαλύματα. Επιπρόσθετα, με μια διεργασία, που ονομάζεται *Chasing Equilibrium*, προσδιορίζεται η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού με εναλλάξ προσθήκη ισχυρού οξέος (HCl) ή ισχυρής βάσης (KOH) ως τιτλοδότη και καταγραφή του ρυθμού μεταβολής της τιμής pH λόγω της καθίζησης ή διάλυσης. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά κάθε δραστικής ουσίας, το διάλυμα από υπέρκορο γίνεται ακόρεστο και αντιστρόφως (σε αυτήν την περίπτωση η ουσία χαρακτηρίζεται ως chaser). Για τις ουσίες που δεν δημιουργούν υπέρκορα διαλύματα, η τιτλοδότησή τους οδηγεί σε άμεση καθίζηση, όταν το pH του διαλύματος φτάνει στην τιμή, κατά την οποία η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας υπερβαίνει τη διαλυτότητα κορεσμού της και στη συνέχεια σε διάλυση του στερεού (nonchaser) [Box et al. 2006]. Στον Πίνακα A.1 αναφέρονται οι ιδιότητες των ουσιών που (δεν) δημιουργούν υπέρκορα διαλύματα με την τεχνική CheqSol<sup>®</sup>. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι ποτενσιομετρικές μέθοδοι είναι αποδεκτές από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ως μέθοδοι για την κατηγοριοποίηση μιας δραστικής ουσίας σε σχέση με τη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού σύμφωνα με το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης (Guidance for Industry, FDA, 2000).

**Πίνακας Α.1:** Χαρακτηριστικά ουσιών, που (δεν) δημιουργούν υπέρκορα διαλύματα με την τεχνική CheqSol® (Box et al. 2009).

<b>Ουσίες που δημιουργούν υπέρκορα υδατικά διαλύματα (chasers)</b>	<b>Ουσίες που δεν δημιουργούν υπέρκορα υδατικά διαλύματα (nonchasers)</b>
<p>Οξέα, βάσεις ή αμφολύτες</p> <p>Καθιζάνουν αργά, διαλύονται αργά</p> <p>Το άθροισμα των θέσεων δότη και δέκτη πρωτονίων στο μόριό τους είναι <math>\geq 3</math></p> <p>Η στερεή μορφή του ελεύθερου οξέος ή της ελεύθερης βάσης είναι πάντα κρυσταλλική</p> <p>Η μη ιονισμένη μορφή έχει υψηλό σημείο τήξης</p> <p>Η διαλυτότητα αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας</p> <p>Με τη χρήση κατάλληλων ουσιών είναι δυνατή μερικές φορές η αύξηση της διάρκειας του υπερκορεσμού και η αναστολή της κρυστάλλωσης</p>	<p>Κυρίως βάσεις</p> <p>Καθιζάνουν γρήγορα, διαλύονται αργά</p> <p>Οι περισσότερες ενώσεις είναι δέκτες πρωτονίων</p> <p>Συνήθως είναι άλατα με κρυσταλλική δομή ή ελεύθερες βάσεις με άμορφη δομή</p> <p>Η μη ιονισμένη μορφή έχει χαμηλό σημείο τήξης, πολλές ουσίες είναι σε υγρή κατάσταση στους 25 °C</p> <p>Η διαλυτότητα δε μεταβάλλεται ή μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας</p>

### A.2.3 Σημασία της διαλυτότητας μετά από *per os* χορήγηση

Σύμφωνα με το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης, τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας και διαπερατότητας ενός μορίου στον ανώτερο ΓΕ αυλό είναι οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν τη διαδικασία της απορρόφησής του μετά από *per os* χορήγηση (Guidance for Industry, FDA, 2000). Η διαλυτότητα στην περιοχή του ανώτερου γαστρεντερικού αυλού (ΓΕ) μπορεί να επηρεάσει τους ρυθμούς ενδοαυλικής διάλυσης/αποδέσμευσης, καθώς και καθίζησης.

Όταν ένα μόριο είναι σταθερό στο περιβάλλον του παχέος εντέρου, παρουσιάζει μικρή διαπερατότητα στην περιοχή του ανώτερου ΓΕ αυλού, χορηγείται μια Φ/Μ παρατεταμένης αποδέσμευσης, ή, τέλος, χορηγείται μια Φ/Μ, η οποία έχει δράση στο παχύ έντερο, ο προσδιορισμός της διαλυτότητας του μορίου στην κατώτερη περιοχή του ΓΕ συστήματος είναι απαραίτητος, διότι αυτή μπορεί να επηρεάσει τους ρυθμούς ενδοαυλικής διάλυσης/αποδέσμευσης, καθώς και καθίζησης.

Η σημασία της ενδοαυλικής διαλυτότητας αυξάνεται με τη λιποφιλία και το σημείο τήξης του μορίου, καθώς και με τη χορηγηθείσα δόση (Reppas and Augustijns, 2010).

Για μια συγκεκριμένη δραστική ουσία, η υπό θεώρηση ενδοαυλική περιοχή, οι συνθήκες χορήγησης και ο τύπος της χορηγούμενης Φ/Μ καθορίζουν εάν είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της κινητικής ή της θερμοδυναμικής διαλυτότητας.

Διαλυτότητα στο στόμαχο κατά τη διαπεπτική περίοδο: Η διαλυτότητα μπορεί να είναι σημαντική στην περίπτωση της χορήγησης υψηλής δόσης της θερμοδυναμικά σταθερής κρυσταλλικής μορφής. Ο χρόνος παραμονής συμβατικών Φ/Μ στο στόμαχο, όμως, είναι περιορισμένος κατά τη διαπεπτική περίοδο και για αυτόν το λόγο η διαλυτότητα στο στόμαχο κατά τη διαπεπτική περίοδο είναι μικρότερης σημασίας σε σχέση με τη διαλυτότητα στο λεπτό έντερο. Ο προσδιορισμός της κινητικής διαλυτότητας πιθανόν να χρειάζεται για δραστικές ουσίες, οι οποίες χορηγούμενες σε υγρή μορφή, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα καθίζησής τους στο στόμαχο (π.χ. λιπιδικές Φ/Μ), για άλατα ελάχιστα διαλυτών ασθενών οξέων (διότι η διάλυση μπορεί να είναι πληρέστερη σε σχέση με την αντίστοιχη της ελεύθερης μορφής του οξέος και, κατά συνέπεια, είναι πιθανός ο υπερκορεσμός των γαστρικών υγρών) και για Φ/Μ, που προκαλούν υπερκορεσμό (Reppas και Augustijns, 2010).

Διαλυτότητα στο στόμαχο κατά την περίοδο πέψης: Εξαιτίας του αυξημένου χρόνου παραμονής στο στόμαχο στην περίοδο πέψης, η αρχική αύξηση των επιπέδων της δραστικής ουσίας στο πλάσμα μπορεί να επηρεάζεται από τον ενδογαστρικό ρυθμό διάλυσης. Επειδή τα συστατικά των τροφών δρουν ως διαλυτοποιητές, ο προσδιορισμός της θερμοδυναμικής διαλυτότητας είναι πρωταρχικής σημασίας σε αυτήν την περίπτωση. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, παρόλα αυτά, ότι άλλοι παράγοντες, όπως η αποσάθρωση των δισκίων άμεσης αποδέσμευσης ή η διάχυση του φαρμάκου στις κολλοειδείς γαστρικές φάσεις μπορεί να επηρεάσουν εξίσου

σημαντικά τους ενδογαστρικούς ρυθμούς διάλυσης/αποδέσμευσης και είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη (Abrahamsson et al. 2004, Diakidou et al. 2009a). Ο προσδιορισμός της κινητικής διαλυτότητας είναι πιθανό να είναι απαραίτητος στην περίπτωση χορήγησης Φ/Μ, που προκαλούν υπερκορεσμό. Η ποσοτικοποίηση της θερμοδυναμικής ή της κινητικής διαλυτότητας μπορεί να είναι μια χρονοβόρος διαδικασία, εξαιτίας των δυσκολιών διαχωρισμού των στερεών από πολυφασικά συστήματα και της πιθανής ανάγκης κατασκευής πολλαπλών καμπυλών αναφοράς, π.χ. στην περίπτωση ιονιζόμενου μορίου, το οποίο εμφανίζει pH-εξαρτώμενη UV απορρόφηση (Βερτζώνη, Διδακτορική Διατριβή, 2004).

**Διαλυτότητα στο ανώτερο λεπτό έντερο κατά τη διαπεπτική περίοδο:** Ο προσδιορισμός της θερμοδυναμικής διαλυτότητας είναι σημαντικός όταν τουλάχιστον ένα μέρος της χορηγούμενης δόσης δε διαλύεται κατά την παραμονή της στο στόμαχο, και όταν χορηγείται η θερμοδυναμικά σταθερή κρυσταλλική μορφή. Ο προσδιορισμός της κινητικής διαλυτότητας γίνεται απαραίτητος όταν οι εισερχόμενες από το στόμαχο συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας είναι μεγαλύτερες από τη διαλυτότητα στην κατάσταση ισορροπίας (π.χ. μετά από χορήγηση ασθενών βάσεων) ή όταν χορηγείται Φ/Μ, που προκαλεί υπερκορεσμό.

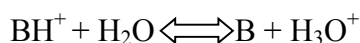
**Διαλυτότητα στο ανώτερο λεπτό έντερο κατά την περίοδο πέψης:** Ο προσδιορισμός της θερμοδυναμικής διαλυτότητας είναι απαραίτητος σε καταστάσεις όμοιες με αυτές που περιγράφηκαν στην παράγραφο για το λεπτό έντερο κατά τη διαπεπτική περίοδο. Παρόλα αυτά, όπως και στην περίπτωση του στόμαχου, άλλοι παράγοντες, όπως η διάχυση του φαρμάκου στις κολλοειδείς φάσεις του εντέρου, είναι πιθανό να είναι τουλάχιστον ίδιας σημασίας και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Ο προσδιορισμός της κινητικής διαλυτότητας είναι σημαντικός στην περίπτωση Φ/Μ, που δημιουργούν υπερκορεσμό. Όπως και στην αντίστοιχη κατάσταση του στομάχου, ο προσδιορισμός της διαλυτότητας μιας δραστικής ουσίας στο λεπτό έντερο κατά την περίοδο πέψης μπορεί να είναι χρονοβόρος.

**Διαλυτότητα κορεσμού στο ανιόν παχύ έντερο:** Το ανιόν τμήμα είναι, ίσως, το μόνο μέρος του παχέος εντέρου, όπου υπάρχει αρκετή ποσότητα υγρού, στο οποίο μπορεί να διαλυθεί/αποδεσμευθεί ή να καθιζήσει μια ουσία. Διαχωρισμός μεταξύ διαπεπτικής και περιόδου πέψης στο ανιόν κόλον δεν έχει πρακτική σημασία. Παρόλα αυτά, κατά τη διάρκεια των συνηθισμένων μελετών

Βιοδιαθεσιμότητας/Βιοϊσοδυναμίας, οι συνθήκες κατά τη διαπεπτική περίοδο και κατά την περίοδο πέψης είναι τελείως διαφορετικές (Diakidou et al. 2009b). Επειδή, η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού στο λεπτό έντερο κατά τη διαπεπτική περίοδο δεν διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη στο ανιόν κόλον κατά τη διαπεπτική περίοδο (Vertzoni et al. 2010), συμπεραίνεται ότι η θερμοδυναμική και όχι η κινητική διαλυτότητα έχει σημασία στο ανιόν κόλον κατά τη διαπεπτική περίοδο. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της πέψης η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού στο ανιόν κόλον είναι δραματικά μικρότερη από την αντίστοιχη στο λεπτό έντερο (Vertzoni et al. 2010), και συνεπώς, στην περίπτωση, που το φάρμακο φτάνει στο κόλον, εξαιτίας της μικρής διαπερατότητάς του στο ανώτερο τμήμα του εντέρου, ο προσδιορισμός της κινητικής διαλυτότητας μπορεί να είναι απαραίτητος.

#### *A.2.4 Θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού μονόξινων ασθενών βάσεων σε συνάρτηση με το pH*

Η απεικόνιση pH-θερμοδυναμικής διαλυτότητας μιας δραστικής ουσίας με ασθενώς βασικές ιδιότητες μπορεί να περιγραφεί από 2 ανεξάρτητες καμπύλες. Η μια καμπύλη βασίζεται σε μετρήσεις διαλυτότητας που το στερεό στην ισορροπία είναι η ελεύθερη μορφή της βάσης, και η δεύτερη από αντίστοιχες μετρήσεις που το στερεό στην ισορροπία είναι το άλας της βάσης (Kramer and Flynn, 1972). Τυπικά, η ισορροπία, η οποία παρατηρείται σε περιπτώσεις που η ελεύθερη μορφή της βάσης ή το άλας αυτής έχουν διαλυθεί στο νερό, είναι η παρακάτω:



και

$$k_a = \frac{[B][H_3O^+]}{[BH^+]} \quad (\text{εξ. A.2})$$

όπου  $BH^+$  και  $B$  αντιστοιχούν στην πρωτονιωμένη μορφή (συζυγές οξύ ή άλας) και στην ελεύθερη μορφή της βάσης, αντίστοιχα. Όταν ένα υδατικό μέσο με δεδομένη τιμή pH είναι κορεσμένο μόνο από την ελεύθερη μορφή της βάσης ή μόνο από το

άλας αυτής, η συνολική διαλυτότητα,  $(C_S)_T$ , της βάσης ή του άλατος σε αυτήν την τιμή pH, εκφράζεται από τις εξισώσεις A.3 και A.4, αντίστοιχα:

$$(C_S)_T, \text{βάσης} = [B]_S + [BH^+] = [B]_S \left( 1 + \frac{[H_3O^+]}{k_a} \right) = [B]_S \left( 1 + 10^{pk_a - pH} \right) \quad (\text{εξ. A.3})$$

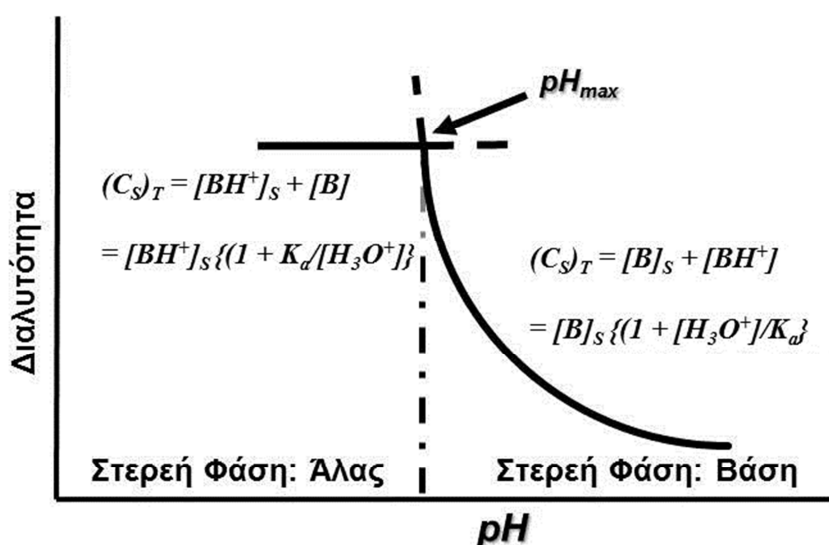
$$(C_S)_T, \text{άλατος} = [BH^+]_S + [B] = [BH^+]_S \left( 1 + \frac{k_a}{[H_3O^+]} \right) = [BH^+]_S \left( 1 + 10^{pH - pk_a} \right) \quad (\text{εξ. A.4})$$

όπου ο δείκτης «s» εκφράζει το είδος, απο το οποίο έχει κορεστεί το διάλυμα στην ισορροπία.

Το σημείο, όπου οι δύο απεικονίσεις pH-διαλυτότητας (με βάση τις εξισώσεις A.3 και A.4) τέμνονται, ονομάζεται  $pH_{\max}$ . Σε αυτήν την τιμή pH παρατηρείται η μέγιστη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού και είναι θεωρητικά δυνατό να συνυπάρχουν ως στερεά τόσο η ελεύθερη μορφή της βάσης, όσο και το άλας αυτής. Στο Σχήμα A.3 παρουσιάζεται σχηματικά το  $pH_{\max}$ , όπου η απεικόνιση της διαλυτότητας σε τιμές pH μεγαλύτερες από  $pH_{\max}$  περιγράφεται από την εξίσωση A.3 και η απεικόνιση της διαλυτότητας σε τιμές pH μικρότερες από  $pH_{\max}$  περιγράφεται από την εξίσωση A.4.

Από το Σχήμα A.3 καταδεικνύεται ότι αν το pH του κορεσμένου διαλύματος με περίσσεια στερεής βάσης μειώνεται από περιοχή μεγαλύτερη της τιμής  $pH_{\max}$  σε περιοχή μικρότερη της τιμής  $pH_{\max}$ , η στερεή φάση θα μετατραπεί στο αντίστοιχο άλας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το pH δε θα γίνει μικρότερο από το  $pH_{\max}$ , παρά μόνο αν προστεθεί επαρκής ποσότητα οξέος, η οποία θα μετατρέψει ολόκληρη την περίσσεια του στερεού της ελεύθερης βάσης στο αντίστοιχο άλας. Το αντίθετο φαινόμενο θα λάβει χώρα αν αρχικά στο διάλυμα υπάρχει στερεό του άλατος της βάσης, δηλαδή θα καθιζήσει στερεό της ελεύθερης μορφής της βάσης, όταν το pH του διαλύματος πάρει τιμή μεγαλύτερη από  $pH_{\max}$  (Serajuddin, 2007). Οι Serajuddin και Mufson (1985) ανέφεραν, ότι η διαλυτότητα της ελεύθερης βάσης παπαβερίνης στους 37 °C αύξανε σταδιακά όταν το pH μειωνόταν με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος στο εναιώρημα, μέχρι τη στιγμή που το pH έγινε 4. Τότε, σε σχεδόν σταθερή τιμή pH 4,0±0,1, η διαλυτότητα αυξήθηκε από <10 mg/mL σε >120 mg/mL. Η διαλυτότητα συνέχισε να αυξάνεται με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος, όσο

υπήρχε στερεό της ελεύθερης βάσης στο εναιώρημα διαθέσιμο προς διάλυση. Παρόλο, που ήταν γνωστό ότι η υδατική διαλυτότητα της υδροχλωρικής παπαβερίνης ήταν 40 mg/mL, δεν υπήρξε σημάδι καθίζησης από το υπέρκορο διάλυμα ως προς το υδροχλωρικό άλας της παπαβερίνης, ακόμη και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 120 mg/mL. Καθίζηση στερεού υδροχλωρικού άλατος της παπαβερίνης παρατηρήθηκε μόνο όταν προστέθηκαν στο υπέρκορο διάλυμα μερικοί κρύσταλλοι υδροχλωρικής παπαβερίνης, κάτι, το οποίο οδήγησε στη δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και καθίζηση του άλατος.



**Σχήμα Α.3:** Σχηματική αναπαράσταση της απεικόνισης της διαλυτότητας μιας δραστικής ουσίας με ασθενώς βασικές ιδιότητες σε συνάρτηση με το pH. Οι διαλυτότητες περιγράφονται από δύο ανεξάρτητες καμπύλες και το σημείο τομής τους είναι το  $pH_{max}$  (Serajuddin, 2007).

Οι Bogardus και Blackwood (1979) πρότειναν ότι για μια δραστική ουσία με ιδιότητες ασθενούς μονόξινης βάσης, οι διαλυτότητες κορεσμού της ελεύθερης μορφής και του άλατος αυτής σε τιμή  $pH=pH_{max}$  μπορούν να θεωρούν ίσες και τότε η τιμή  $pH_{max}$  δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$pH_{max} = pk_a + \log \frac{[B]_S}{\sqrt{k_{sp}}} \quad (\text{εξ. A.5})$$

όπου  $k_{sp}$  είναι το γινόμενο διαλυτότητας:

$$k_{sp} = [BH^+]_S [X^-] \quad (\text{εξ. A.6})$$

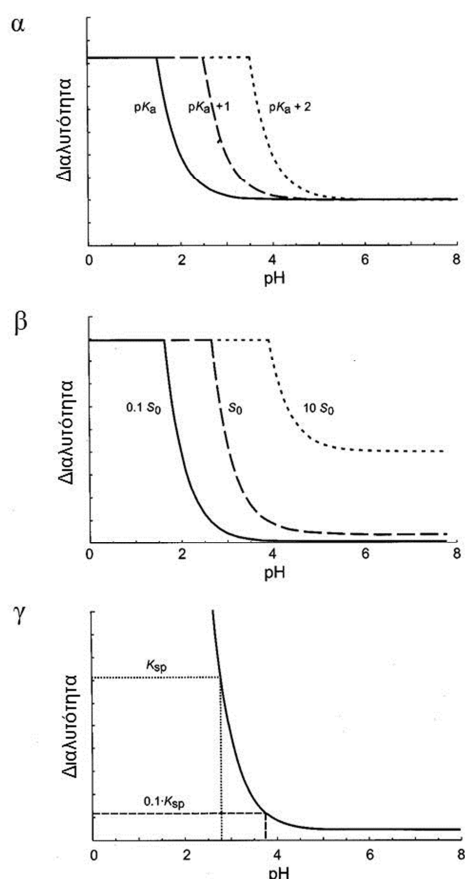
Οι Pudipeddi et al. (2002) μελέτησαν την επίδραση της ενδογενούς διαλυτότητας  $[(C_S)_0$  ή  $[B]_S]$  και των τιμών  $pK_a$  και  $k_{sp}$  στην τιμή  $pH_{max}$ , σύμφωνα με την εξίσωση A.5 και κατέληξαν στα εξής:

α) αύξηση της τιμής  $pK_a$  κατά μία μονάδα προκαλεί αύξηση κατά μία μονάδα της τιμής  $pH_{max}$ ,

β) αύξηση της ενδογενούς διαλυτότητας,  $(C_S)_0$ , της βάσης κατά μία τάξη μεγέθους προκαλεί αύξηση κατά μία μονάδα της τιμής  $pH_{max}$ ,

γ) μείωση του γινομένου διαλυτότητας του άλατος κατά μία τάξη μεγέθους προκαλεί αύξηση κατά μία μονάδα της τιμής  $pH_{max}$ .

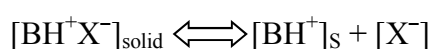
Τα παράπανω συμπεράσματα συνοψίζονται σχηματικά στο Σχήμα A.4. Από το Σχήμα A.4 γίνεται αντιληπτό ότι υψηλή τιμή του  $pK_a$ , υψηλή ενδογενής διαλυτότητα της βάσης και μικρή διαλυτότητα του άλατος μπορεί να ευνοήσουν τη δημιουργία άλατος της βάσης λόγω αύξησης της τιμής  $pH_{max}$ .



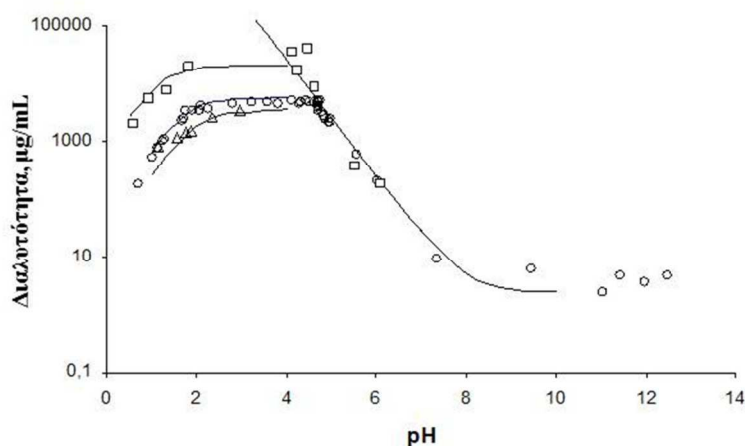
**Σχήμα A.4:** Επίδραση της τιμής (α)  $pK_a$ , (β)  $(C_S)_0$ , και (γ)  $k_{sp}$  στην τιμή  $pH_{max}$  μιας μονόξινης βάσης (Pudipeddi et al. 2002).



Στο Σχήμα A.5 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα απεικονίσεων της θερμοδυναμικής διαλυτότητας μιας μονόξινης βάσης (αλοπεριδόλης) σε σχέση με το pH, που προέκυψαν με τη χρήση διαφόρων οξέων. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση της διαλυτότητας του μεθανοσουλφονικού, υδροχλωρικού και φωσφορικού άλατος της αλοπεριδόλης για τιμές pH < 2,5. Αυτό οφείλεται στην επίδραση του κοινού ιόντος, διότι τα οξέα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να μειώσουν το pH δημιούργησαν περίσσεια ιόντων. Για το άλας μιας δραστικής ουσίας με ασθενώς βασικές ιδιότητες, η επίδραση κοινού ιόντος στη διαλυτότητα μπορεί να εξηγηθεί από την παρακάτω ισορροπία, η οποία υπάρχει σε τιμές pH μικρότερες από το pH<sub>max</sub>:

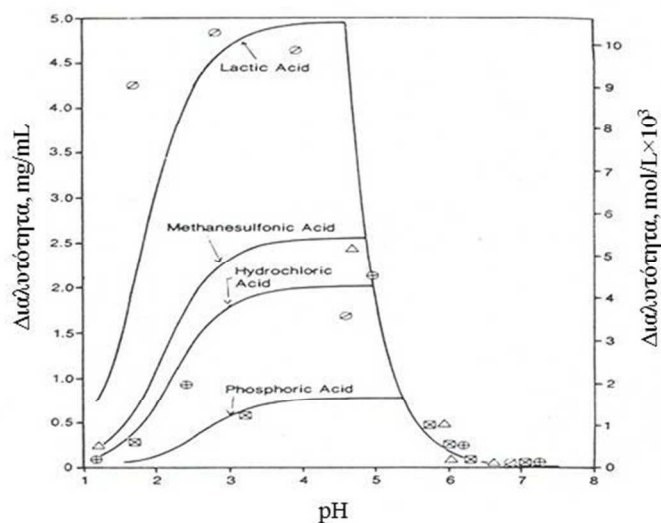


όπου  $[BH^+X^-]_{solid}$  το στερεό του άλατος, το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία με τα διαλύματα κορεσμού του άλατος,  $[BH^+]_s$ , και  $[X^-]$  η συγκέντρωση του ανιόντος. Απουσία περίσσειας ανιόντων,  $[BH^+]_s = [X^-]$ , και επομένως με βάση την εξίσωση A.5,  $[BH^+]_s = \sqrt{k_{sp}}$ . Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η διαλυτότητα του άλατος παραμένει σταθερή, όπως φαίνεται και στην επίπεδη περιοχή της διαλυτότητας του άλατος στο Σχήμα A.5. Όμως, αν υπάρξει σημαντική περίσσεια ανιόντος (όπως π.χ. όταν επιχειρείται σημαντική μείωση του pH) παρατηρείται μείωση της διαλυτότητας σύμφωνα με την εξίσωση A.5, που θα έχει τη μορφή  $[BH^+]_s = k_{sp} / [X^-]$  (Serajuddin, 2007). Η παρουσία κοινού ιόντος έχει ιδιαίτερη σημασία στη διαλυτότητα και στο ρυθμό διάλυσης υδροχλωρικών αλάτων στο στόμαχο (Li et al. 2005).



**Σχήμα Α.5:** Απεικονίσεις θερμοδυναμικής διαλυτότητας της αλοπεριδόλης σε σχέση με το pH. Το pH ρυθμίστηκε με τη χρήση του μεθανοσουλφονικού (□), υδροχλωρικού (○) και του φωσφορικού (Δ) οξέος (Serajuddin, 2007).

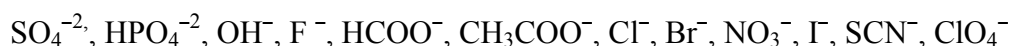
Εκτός από την περίπτωση της αλοπεριδόλης, της οποίας η υδατική διαλυτότητα διέφερε ανάλογα με το οξύ, που χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του pH, οι Streng et al. (1984) ανέφεραν ότι οι διαλυτότητες των αλάτων τερφεναδίνης, που δημιουργήθηκαν με φωσφορικό, υδροχλωρικό, μεθανοσουλφονικό και γαλακτικό οξύ, διέφεραν μεταξύ τους μέχρι και 10 φορές (Σχήμα Α.6). Συγκεκριμένα, τα δείγματα ετοιμάστηκαν τοποθετώντας 200 mg της τερφεναδίνης σε φιαλίδια των 30 mL και προσθέτοντας 25 mL υδατικού διαλύματος των παραπάνω οξέων διαφορετικής συγκέντρωσης σε κάθε φιαλίδιο. Αυτά σκεπάστηκαν κατάλληλα και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας και παρέμειναν εκεί για 4 ημέρες μέχρι να υπάρξει ισορροπία. Στη συνέχεια, ακολούθησε διήθηση μέσω ηθμών με άνοιγμα πόρων 0,45 µm και προσδιορισμός της συγκέντρωσης σε κάθε δείγμα με HPLC-UV.



**Σχήμα Α.6:** Διάγραμμα pH-διαλυτότητας της τερφεναδίνης με διαφορετικά οξέα: α) γαλακτικό οξύ [Ø], β) υδροχλωρικό οξύ [⊕], γ) μεθανοσουλφονικό οξύ [Δ] και δ) φωσφορικό οξύ [⊗].

Οι τιμές  $pK_{sp}$  των αλάτων της τερφεναδίνης με το φωσφορικό, υδροχλωρικό, μεθανοσουλφονικό και γαλακτικό οξύ βρέθηκαν 5,6, 4,8, 4,6 και 4,05, αντίστοιχα. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή  $pK_{sp}$ , τόσο χαμηλότερη είναι η διαλυτότητα του άλατος. Συνεπώς, η διαλυτότητα της τερφεναδίνης είναι η ελάχιστη στα διαλύματα εκείνα, στα οποία έχει προστεθεί υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος και η μέγιστη στα διαλύματα εκείνα, τα οποία περιέχουν γαλακτικό οξύ. Από το Σχήμα Α.6 φαίνεται, ότι η τερφεναδίνη εμφανίζει μέγιστη διαλυτότητα και στα τέσσερα οξέα για τιμές pH μεταξύ 4,5 και 5,5. Η μείωση της διαλυτότητας σε τιμές pH μεγαλύτερες από 5,5 οφείλεται στο μη ιονισμό της τερφεναδίνης. Σε πολύ χαμηλές τιμές pH η τερφεναδίνη εμφανίζει πολύ μικρή διαλυτότητα εξαιτίας της έντονης παρουσίας του ανιόντος, που έχει προστεθεί κατά τη ρύθμιση του pH.

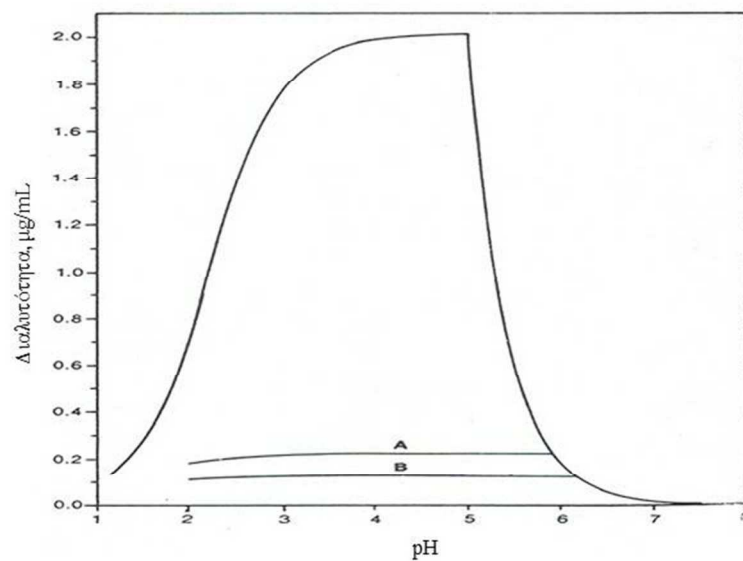
Η σειρά Hofmeister κατατάσσει τα ιόντα σύμφωνα με την ικανότητά τους να αυξάνουν τη διαλυτότητα μιας βάσης. Έτσι, έχουμε:



Τα ιόντα αριστερά του  $\text{Cl}^-$ , το οποίο αποτελεί ένα είδος συνόρου, μειώνουν τη διαλυτότητα ευνοώντας την κρυσταλλοποίηση. Αυτά ονομάζονται γενικά, ως ιόντα που μειώνουν τη διαλυτότητα ή δημιουργοί δομής νερού (water-structure-makers) ή

κοσμοτροπικά ιόντα. Το αντίθετο ισχύει για τα ιόντα, τα οποία βρίσκονται δεξιά του  $\text{Cl}^-$ , και χαρακτηρίζονται ως ιόντα που αυξάνουν τη διαλυτότητα ή διασπαστές της δομής νερού (water-structure-brakers) ή χαοτροπικά ιόντα. Αυτά ευνοούν την αλλαγή φύσης της ένωσης, κάτι το οποίο οδηγεί σε αυξημένη διαλυτότητα. Εκτεταμένα πειράματα πάνω από έναν αιώνα έδειξαν ότι η ανιονική σειρά Hofmeister παίζει ένα σημαντικό ρόλο σε μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών και φυσικοχημικών φαινομένων (Leontidis, 2002).

Τελειώνοντας την αναφορά στη διαλυτότητα μιας ασθενούς βάσης και στους παράγοντες, που την επηρεάζουν, κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ότι στην περίπτωση της ενδογαστρικής διάλυσης υδροχλωρικών αλάτων, χλωριούχα ανιόντα είναι παρόντα όχι μόνο λόγω της παρουσίας υδροχλωρικού οξέος, αλλά πιθανότατα και λόγω της παρουσίας κατιόντων νατρίου (η έκκριση των οποίων συνοδεύεται από αντίστοιχη έκκριση χλωριούχων ανιόντων για τη διατήρηση του ηλεκτροχημικού δυναμικού). Οι Streng et al. (1984) μελέτησαν τη συνδυασμένη επίδραση της προσθήκης  $\text{NaCl}$  και διαλύματος υδροχλωρικού οξέος στην υδατική διαλυτότητα του υδροχλωρικού άλατος της τερφεναδίνης. Η διαλυτότητα στην περιοχή τιμών  $\text{pH}$  3-6 μειώθηκε περίπου 10 φορές, όταν προστέθηκε στο διάλυμα 0,05 M  $\text{NaCl}$ , ενώ σε  $\text{pH} < 3$  η διαλυτότητα μειώθηκε περαιτέρω εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης χλωριούχων ανιόντων λόγω του υδροχλωρικού διαλύματος, που προστέθηκε για προσαρμογή του  $\text{pH}$  (Σχήμα A.7). Η διαλυτότητα στην ίδια περιοχή τιμών  $\text{pH}$  μειώθηκε ακόμη περισσότερο, όταν προστέθηκε στο διάλυμα 0,1 M  $\text{NaCl}$  (Σχήμα A.7). Η συνολική επίδραση των ιόντων στη διαλυτότητα των αλάτων εξαρτάται από την τιμή  $k_{sp}$ . Σε περίπτωση ίσων συγκεντρώσεων ιόντων  $[X^-]$ , η επίδραση κοινού ιόντος θα είναι λιγότερο εμφανής σε ένα άλας με μεγαλύτερη  $k_{sp}$  (και επομένως μεγαλύτερης διαλυτότητας) σε σχέση με ένα άλας με μικρότερη  $k_{sp}$  (και επομένως μικρότερης διαλυτότητας) [Serajuddin, 2007].



**Σχήμα A.7:** Απεικονίσεις διαλυτότητας της τερφεναδίνης σε σχέση με το pH, το οποίο ρυθμίστηκε με τη χρήση διαλύματος υδροχλωρικού οξέος, χωρίς προσθήκη ποσότητας NaCl, μετά την προσθήκη 0,05 M NaCl (A) και μετά την προσθήκη 0,1 M NaCl (B).

### A.3 Υπερκορεσμός

Η εξέλιξη των μεθόδων μορφοποίησης μιας δραστικής ουσίας σε σκεύασμα λογικού κόστους και η ανάπτυξη της Συνδυαστικής Χημείας έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη ουσιών με περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό ή/και μικρή ικανότητα διαλυτοποίησης, οι οποίες θα απορρίπτονταν τις προηγούμενες δεκαετίες (Wenlock et al. 2003, Stegenmann et al. 2007). Οι εξελιγμένες μέθοδοι μορφοποίησης παρέχουν τη δυνατότητα επίτευξης ενδοαυλικών συγκεντρώσεων μιας δραστικής ουσίας μεγαλύτερων από τη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού, δηλ. υπέρκορων συγκεντρώσεων, με αποτέλεσμα αυξημένη ροή της δραστικής ουσίας στον εντερικό βλεννογόνο (Brouwers et al. 2009). Ορισμένες φορές αυτές οι συγκεντρώσεις καλούνται φαινόμενη διαλυτότητα (Mosharraf et al. 1999, Watanabe et al. 2002).

Ο υπερκορεσμός μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με το κλάσμα υπερκορεσμού (supersaturation ratio)  $SR$ :

$$SR = \frac{C}{C_s} \quad (\text{εξ. A.6})$$

όπου  $C_s$  αντιστοιχεί στη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού. Ένα διάλυμα χαρακτηρίζεται ως ακόρεστο, κορεσμένο ή υπέρκορο όταν ισχύουν οι παρακάτω σχέσεις:  $SR < 1$ ,  $SR = 1$ , ή  $SR > 1$ , αντίστοιχα (Brouwers et al. 2009). Ένας εναλλακτικός τρόπος ποσοτικοποίησης του υπερκορεσμού είναι ο δείκτης υπερκορεσμού (supersaturation index)  $\sigma$ , που ορίζεται ως ακολούθως:

$$\sigma = SR - 1 = \frac{C}{C_s} - 1 \quad (\text{εξ. A.7})$$

Ένα διάλυμα χαρακτηρίζεται ως ακόρεστο, κορεσμένο ή υπέρκορο όταν ισχύουν οι παρακάτω σχέσεις:  $\sigma < 0$ ,  $\sigma = 0$ ,  $\sigma > 0$ , αντίστοιχα (Brouwers et al. 2009).

Για να είναι δυνατή η χρήση του υπερκορεσμού ως στρατηγική αύξησης της απορρόφησης των δυσδιάλυτων δραστικών ουσιών από το έντερο, πρέπει να λάβουν χώρα δύο διαδικασίες: η γένεση και η διατήρηση του φαινομένου του υπερκορεσμού. Για να είναι εφικτό αυτό πρέπει η δραστική ουσία να είναι σε μορφή που να δίνει τη δυνατότητα υπέρκορου διαλύματος. Η προσέγγιση αυτή έχει ονομαστεί «προσέγγιση

άλματος και αλεξίπτωτου» [«spring and parachute approach»] (Guzmán et al. 2007). Συγκεκριμένα, ένα θερμοδυναμικά ασταθές, υπέρκορο διάλυμα μιας δραστικής ουσίας ενδοαυτικά μπορεί να είναι αποτέλεσμα Φ/Μ με υψηλότερη ελεύθερη ενέργεια (άλμα, spring). Υψηλής ελεύθερης ενέργειας στερεές μορφές μπορεί να είναι άμορφα στερεά, κρυσταλλικά άλατα, ή συγκρυσταλλοί με άλλη ουσία. Επίσης, οι σύγχρονες επιλογές μορφοποίησης επιτρέπουν τη δημιουργία υπέρκορων διαλυμάτων στα ΓΕ υγρά, χορηγώντας το δραστικό συστατικό διαλυμένο σε μικρή ποσότητα μίγματος διαλυτών, σε υγρό λιπιδικό φορέα, σε αποικοδομούμενες ενδοαυτικά κυκλοδεξτρίνες κ.ά. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι υπερκορεσμός των ενδοαυτικών περιεχομένων με μια ιονιζόμενη ουσία είναι δυνατό να συμβεί απλά και μόνο λόγω της διαβάθμισης των τιμών pH κατά μήκος του ΓΕ αυλού. Σε κάθε περίπτωση, για να εξασφαλισθεί ο επαρκής χρόνος διατήρησης της υπέρκορης κατάστασης (ώστε να ολοκληρωθεί σημαντικό ποσοστό της απορρόφησης) είναι πιθανό να απαιτηθεί η χρήση εκδόχων, τα οποία εμποδίζουν τη δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης ή/και την αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων, δηλ. επιβραδυντών καθίζησης [αλεξίπτωτο, parachute] (Brouwers et al. 2009).

#### *A.3.1 Συστήματα χορήγησης δραστικών ουσιών που προκαλούν υπερκορεσμό*

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί παραδείγματα συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, τα οποία προκαλούν υπερκορεσμό *in vitro*, και έχει διερευνηθεί η πιθανότητα αυξημένης απορρόφησης τους *in vivo*. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει στερεές Φ/Μ, που περιέχουν αποικοδομούμενους ενδοαυτικά παράγοντες διαλυτοποίησης (Strickley, 2004, Strickley και Oliyai, 2007) ή το δραστικό συστατικό σε μορφή υψηλής ενέργειας (Brouwers et al. 2009).

Η μορφοποίηση με βιοαποικοδομούμενους διαλυτοποιητικούς παράγοντες και η διασπορά και αραίωση της Φ/Μ στο ΓΕ αυλό δημιουργούν ένα πολύπλοκο μίγμα κολλοειδών σχηματισμών αποτελούμενο από τα συστατικά της Φ/Μ και φυσιολογικά ενδοαυτικά συστατικά (όπως χολικά άλατα και φωσφολιπίδια). Κατά την *in vitro* εκτίμηση της συμπεριφοράς τέτοιων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, είναι απαραίτητο να εξακριβωθεί ο ρυθμός και η έκταση της καθίζησης σε συνθήκες που

προσομοιώνουν το ενδοαυλικό περιβάλλον (Narang et al. 2007, Routon και Porter, 2008).

Στην περίπτωση χορήγησης υγρής λιπιδικής Φ/Μ έχει παρατηρηθεί ότι η πιθανότητα καθίζησης της δραστικής ουσίας αμέσως μετά τη διασπορά της στα ΓΕ υγρά είναι αυξημένη, ιδιαίτερα όταν αυτές περιέχουν σχετικά υψηλές ποσότητες αναμίξιμων με το νερό επιφανειοδραστικών ουσιών ή συν-διαλύτες. Η διαλυτοποιητική ικανότητα των συν-διαλυτών μειώνεται απότομα κατά την αραιώση, δεδομένης της λογαριθμικής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης του συν-διαλύτη και της διαλυτότητας της δραστικής ουσίας (Martin et al. 1982, Brewster et al. 2007). Ένας τρόπος να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της ενδοαυλικής καθίζησης μετά απο χορήγηση λιπιδικής Φ/Μ είναι η ενσωμάτωση επιβραδυντή της καθίζησης, συνήθως υδρόξυ-προποπυλο-μεθυλο-κυτταρίνης (HPMC) ή/και η αύξηση της ελεύθερης (μη μικκυλιακής) συγκέντρωσης του φαρμάκου με τη χρήση μικρότερων ποσοτήτων επιφανειοδραστικών. Αυτή η προσέγγιση ελέγχθηκε με τη χρήση του αντικαρκινικού παράγοντα πακλιταξέλη (Gao et al. 2003). Το μόριο της πακλιταξέλης δεν διαθέτει λειτουργικές ομάδες που να ιονίζονται με μεταβολή του pH ή να επιτρέπουν τη δημιουργία άλατος, ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητά της. Το εμπορικό σκεύασμα Taxol<sup>®</sup> είναι μια Φ/Μ που περιέχει διαλυτοποιητικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, *per os* χορήγηση της πακλιταξέλης, της οποίας η απορρόφηση πιθανόν να συνδέεται με την P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), διαλυμένης σε αιθανόλη και σε υψηλές συγκεντρώσεις του επιφανειοδραστικού Cremophor<sup>®</sup> EL (η Φ/Μ που χρησιμοποιείται για ενδοφλέβια χορήγηση) σε αρουραίους δεν οδήγησε σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις πακλιταξέλης στο πλάσμα. Θεωρήθηκε ότι η παρατήρηση σχετίζεται με τη μειωμένη ποσότητα της ελεύθερης μορφής της πακλιταξέλης και τη διαλυτοποίησή της σε μεγάλη ποσότητα επιφανειοδραστικού. Οι Gao et al. (2003) ανέπτυξαν μια νέα Φ/Μ με μειωμένη ποσότητα Cremophor<sup>®</sup> EL. Αραίωση της παραπάνω Φ/Μ σε μέσο που προσομοιώνει το γαστρικό υγρό οδήγησε σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τη διαλυτότητα κορεσμού και σε υποτυπώδη καθίζηση. Ο ρυθμός καθίζησης μειώθηκε ακόμη περισσότερο με τη χρήση 5 % HPMC. *Per os* χορήγηση σχετικής Φ/Μ σε αρουραίους είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκτασης της απορρόφησης της πακλιταξέλης. Παρόμοιες Φ/Μ αναπτύχθηκαν και για δύο άλλες δραστικές ουσίες, που βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης, PNU-91325 (Gao et al. 2004) και AMG 517 (Gao et al.



2009). Από αυτές τις μελέτες καταδεικνύεται ότι συστήματα μεταφοράς, που περιέχουν περιορισμένη ποσότητα επιφανειοδραστικού και επιβραδυντή καθίζησης, επιτυγχάνουν τη δημιουργία και διατήρηση αυξημένων ενδοαυλικών συγκεντρώσεων του ελεύθερου φαρμάκου, πάνω από τη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού, και κατά συνέπεια, αποτελούν μια αξιόλογη επιλογή μορφοποίησης δυσδιάλυτων δραστικών ουσιών.

Επιπρόσθετα, η πιθανότητα καθίζησης μετά την ενδοαυλική διασπορά λιπιδικής Φ/Μ σχετίζεται με τη διαδικασία της λιπόλυσης των συστατικών της. Ταχέως πεπτόμενα συστατικά μειώνουν τη διάρκεια διατήρησης υπερκορεσμού. Έχει μελετηθεί η καθίζηση της κινναραζίνης που είναι μια ασθενής βάση ( $pK_{a1}$  συζυγούς οξέος 1,95 και  $pK_{a2}$  συζυγούς οξέος 7,5), και ανήκει στην Τάξη II του Συστήματος Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης, κατά τη διάρκεια της *in vitro* λιπόλυσης ενός μικρο-αυτογαλακτοποιούμενου συστήματος χορήγησης φαρμάκου [SMEDDS] (Sassene et al. 2010). Αυτή η Φ/Μ, εκτός από την κινναραζίνη, περιείχε σησαμέλαιο ως λιπιδική φάση, Cremophor RH40 και Brij 97 ως υδρόφιλα επιφανειοδραστικά, ελαϊκό οξύ ως συν-επιφανειοδραστικό και αιθανόλη ως συνδιαλύτη. Το σησαμέλαιο από όλα τα παραπάνω συστατικά αποτελεί το μόνο υπόστρωμα για λιπόλυση. 195 mL μέσου τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενο διπλότοιχο ποτήρι. 1,5 mL της Φ/Μ (1,3 g), με ή χωρίς 66 mg κινναραζίνης, και 3,5 mL νερό Milli-Q προστέθηκαν στο μέσο. Ακολούθησε χρόνος εξισορρόπησης για 2 min πριν από την έναρξη της λιπόλυσης, ώστε να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία (37 °C) και pH (6,5). Η λιπόλυση άρχισε με την προσθήκη 100 mL εκχυλίσματος παγκρεατικής λιπάσης (800 USP units/mL) μέσα σε 10 s, ακολουθούμενη από προσθήκη 0,045 mmol/min KCl, και προσθήκη ιόντων ασβεστίου, που επιτρέπουν στη λιπόλυση να λαμβάνει χώρα υπό ελεγχόμενο ρυθμό (Sassene et al. 2010). Κατά τη διάρκεια της λιπόλυσης το pH παρέμενε σταθερό (6,5) με προσθήκη 1,00 M διαλύματος NaOH. Μελέτες περίθλασης ακτίνων-X σε σκόνη (XRPD) και μικροσκοπίας πολωμένου φωτός (PLM) των στερεών σωματιδίων κινναραζίνης που καθίζησαν απέδειξαν ότι η δομή της κινναραζίνης, που προκύπτει από την *in vitro* λιπόλυση, δεν είναι κρυσταλλική (Sassene et al. 2010).

Εκτός από τις υγρές λιπιδικές Φ/Μ, υπάρχουν και συστήματα χορήγησης της δραστικής ουσίας σε στερεή κατάσταση, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε

υπερκορεσμό στο ΓΕ αυλό. Σε αυτήν την περίπτωση, οι δραστικές ουσίες χορηγούνται σε μορφή υψηλής ενέργειας, που διαλύεται τάχιστα (Appel et al. 2006). Υπάρχουν διάφορες τεχνικές δημιουργίας σωματιδίων υψηλής ενέργειας, όπως η λειοτρίβιση, η λυοφιλοποίηση, θερμότητα διέλαση (hot melt extrusion) κ.ά. Οι στερεές μορφές υψηλής ενέργειας διαλύονται τάχιστα λόγω της μορφής, αλλά και του μεγέθους και της ικανότητας διαβροχής των σωματιδίων (Miller et al. 2007). Λιγότερο σταθερές πολυμορφικές δομές ή άμορφα στερεά απαιτούν λιγότερη ενέργεια για να διαλυθούν, με αποτέλεσμα να δημιουργείται υψηλότερη φαινόμενη διαλυτότητα και αυξημένος ρυθμός διάλυσης (Higuchi et al. 1967, Hancock και Parks, 2000). Η αυξημένη ικανότητα διαβροχής επιτυγχάνεται με τη δημιουργία συστημάτων διασποράς. Τα στερεά συστήματα διασποράς περιέχουν δραστική ουσία σε άμορφη κατάσταση διασπαρμένη σε έναν υδρόφιλο φορέα αποτελούμενο από ένα ή περισσότερα πολυμερή [π.χ. πολυβινυλπυρρολιδόνη [PVP], πολυαιθυλενογλυκόλες [PEG], παράγωγα κυτταρίνης, κ.ά.) ή/και επιφανειοδραστικά, όπως Inutec<sup>®</sup> SP1, Gelucire<sup>®</sup>, poloxamer 407, κ.ά.] (Leuner and Dressman, 2000, Vasconcelos et al. 2007). Τα χαρακτηριστικά διάλυσης αυτών των συστημάτων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη φυσική κατάσταση, συνήθως άμορφη, τη δυνατότητα διασποράς, συνήθως μοριακή διασπορά, και από το μέγεθος των σωματιδίων της δραστικής ουσίας. Επομένως, η ενσωμάτωση της δραστικής ουσίας στο φορέα, η σύσταση του φορέα και η μέθοδος παρασκευής του συστήματος υπαγορεύουν τον αρχικό βαθμό υπερκορεσμού (Urbanetz και Lippold, 2005). Η διάρκεια του υπερκορεσμού εξαρτάται από την παρουσία στο φορέα συστατικών που διαλύονται μαζί με το φορέα και τη δραστική ουσία, και τα οποία δρουν κατά κύριο λόγο ως επιβραδυντές της καθίζησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου συστήματος είναι το εμπορικά διαθέσιμο καψάκιο ιτρακοναζόλης Sporanox<sup>®</sup>. Για τους επιστήμονες, που ασχολούνται με τη μορφοποίηση των δραστικών ουσιών, όμως, αποτελεί μεγάλη πρόκληση η αποφυγή του φαινομένου της επανακρυστάλλωσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Brouwers et al. 2009).

Ένα άλλο παράδειγμα επιτυχημένης χρήσης επιβραδυντών καθίζησης σε μια Φ/Μ αποτελεί το αντικαρκινικό σκεύασμα Iressa<sup>®</sup> (γεφτινίβη, δίπλωμα ευρεσιτεχνίας US2005/0163835). Στο στάδιο της προ-μορφοποίησης, η σύμμιξη του HPMC (Grade 2910, Pharmacoat 606), του μετά νατρίου άλατος της καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνης (CMC) ή της μεθυλ-κυτταρίνης (Methocel MC, 10-25cps) με το δραστικό συστατικό

οδήγησε σε πιο σταθερή μεταφορά αυτού του αντικαρκινικού παράγοντα (Gellert et al. 2005). Συγκέντρωση πολυμερούς 3 %-10 % της περιεκτικότητας της δραστικής ουσίας μείωσε το ρυθμό καθίζησης *in vitro*. Αυτά τα πολυμερή, αν προστεθούν σε μια Φ/Μ, μπορούν να δράσουν είτε ως συνδετικά (HPMC/MC) ή/και ως αποσαθρωτικά (CMC). Τέλος, στο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας WO/2005/011647 (Bateman et al. 2005) χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό ένας επιβραδυντής καθίζησης και ένας παράγοντας οξίνισης με στόχο τη βελτίωση της *in vivo* συμπεριφοράς της γεφιτινίβης. Για το σκοπό αυτό αναπύχθηκε μια Φ/Μ, η οποία περιείχε 250 mg δραστικής ουσίας, 350 mg ενός οξέος, και 75-400 mg HPMC.

Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και η βελτιωμένη διαβροχή αυξάνουν τη διαθέσιμη για διάλυση επιφάνεια του στερεού, με αποτέλεσμα να αυξηθεί και ο ρυθμός διάλυσης. Επιπρόσθετα, τα νανοσωματίδια μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη φαινόμενη διαλυτότητα (Keck και Müller, 2006). Η δημιουργία ενός μίγματος με τη μέθοδο jet-milling, όπου το φυσικό μίγμα της υπό ανάπτυξη δραστικής ουσίας EMD 50733 είχε αλεσθεί μαζί με λακτόζη προς δημιουργία μικροσωματιδίων, οδήγησε σε περιορισμένο υπερκορεσμό και κατ' επέκταση σε αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα (Vogt et al. 2008).

Πρόσφατα, ανόργανα υλικά, όπως το οξείδιο του πυριτίου, έχουν μελετηθεί ως φορείς για τη μεταφορά ελάχιστα διαλυτών ουσιών στο νερό (Salonen et al. 2005, Kaukonen et al. 2007). Οι Mellaerts et al. (2008) ανέπτυξαν μια Φ/Μ ιτρακοναζόλης χρησιμοποιώντας ως φορέα διαταγμένο μεσοπορώδες οξείδιο του πυριτίου (ordered mesoporous silica, OMS). Η ιτρακοναζόλη μπορεί να διασπαρεί μοριακά μέσα σε αυτούς τους πόρους μέχρι ένα συγκεκριμένο βαθμό. Η εισροή και η ανταγωνιστική προσρόφηση νερού από τους πόρους οδηγούν σε ταχεία αποδέσμευση της ιτρακοναζόλης. Η μελέτη αποδέσμευσης της ασθενούς βάσης ιτρακοναζόλης από αυτόν το φορέα σε υγρό, που προσομοιώνει τα περιεχόμενα του στομάχου, απέδειξε τη δυνατότητα δημιουργίας υπερκορεσμού στο γαστρικό υγρό. Μελέτη σε υγρό, που προσομοιώνει τα περιεχόμενα του εντερικού αυλού, απέδειξε περιορισμένη καθίζηση, ενώ ο υπερκορεσμός διατηρήθηκε για 4 h.

Συγκρύσταλλοι (co-crystals) και άλατα με κρυσταλλική δομή, ίσως, παρέχουν βελτιωμένη διαλυτότητα και χαρακτηριστικά διάλυσης και ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από θερμοδυναμική σταθερότητα (Blagden et al. 2007). Άλατα

ασθενών βάσεων ή ασθενών οξέων σε κρυσταλλική μορφή συχνά παρουσιάζουν ταχύτερη διάλυση και μεγαλύτερη φαινόμενη διαλυτότητα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ελεύθερες βάσεις ή τα αντίστοιχα ελεύθερα οξέα. Για αυτόν το λόγο, η διάλυση ενός άλατος μπορεί να οδηγήσει σε υπερκορεσμό. Ένα πλεονέκτημα της χρήσης κρυσταλλικών μορφών αλάτων σε σχέση με άμορφη δομή ελεύθερου οξέος ή βάσης είναι ότι τα πρώτα παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα κατά την αποθήκευση (Brouwers et al. 2009). Πιθανόν, όμως, η χρήση κρυσταλλικών αλάτων χωρίς παράλληλη χρήση επιβραδυντών της καθίζησης να μην έχει πρακτικό αποτέλεσμα λόγω μη διατήρησης του υπερκορεσμού για ικανοποιητικό χρονικό διάστημα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης είναι τα άλατα του Celecoxib, τα οποία εμφανίζουν αυξημένη διαλυτότητα, αλλά επανακρυσταλλώνονται ως ελεύθερο οξύ σχεδόν αμέσως μετά τη διάλυση. Παρόλα αυτά, αποδείχτηκε ότι ο υπερκορεσμός υγρού που προσομοιώνει τα περιεχόμενα του στομάχου με Celecoxib μπορεί να διατηρηθεί για τουλάχιστον 30 min με την ενσωμάτωση επιβραδυντών καθίζησης, μίγματος επιφανειοδραστικών (TPGS ή Pluronic® F127) και υδροξυ-προπυλο-κυτταρίνης [HPC] (Guzmán et al. 2007).

Μια ιδιαίτερη περίπτωση για την αποφυγή των προβλημάτων διάλυσης των ελάχιστα διαλυτών στο νερό δραστικών ουσιών είναι η χορήγηση προφαρμάκων με βελτιωμένη διαλυτότητα κορεσμού ή/και χαρακτηριστικά διάλυσης, τα οποία μετατρέπονται σε φαρμακολογικά δραστικά μόρια στο έντερο (Stella και Nti-Addae, 2007). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελάχιστα διαλυτών στο νερό δραστικών ουσιών, που χορηγούνται ως προφάρμακα φωσφορικού εστέρα, είναι η φαινυτοΐνη και η αμπρεναβίρη, οι οποίες χορηγούνται ως φωσφαινυτοΐνη και ως φωσαμπρεναβίρη, αντίστοιχα. Το φορτισμένο προφάρμακο διαλύεται τάχιστα στο ΓΕ αυλό, αλλά η διάχυση μέσω των βιολογικών μεμβρανών είναι περιορισμένη και για να είναι δυνατή η πρόσληψη της δραστικής ουσίας από το εντερικό επιθήλιο απαιτείται η αποφωσφορυλίωση του προφαρμάκου από την αλκαλική φωσφατάση του αυλού του λεπτού εντέρου (Heimbach et al. 2003b, Brouwers et al. 2007). Η πιθανότητα καθίζησης της δραστικής ουσίας πριν από την πρόσληψή της από το εντερικό επιθήλιο έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα βασικά προβλήματα στην επιτυχία της χορήγησης φωσφορικών εστέρων, ως προφάρμακα (Heimbach et al. 2003a).

### *A.3.2 Διαφορές των συστημάτων χορήγησης δραστικών ουσιών, τα οποία προκαλούν υπερκορεσμό, σε σχέση με αυτά που βασίζονται στη διαλυτοποίηση*

Στόχος των συστημάτων, τα οποία προκαλούν υπερκορεσμό, είναι η δημιουργία μιας θερμοδυναμικά ασταθούς κατάστασης, που οδηγεί σε υπερκορεσμό. Η διάρκειά της επιμηκύνεται με τη χρήση επιβραδυντών καθίζησης. Αντίθετα, με τη χρήση των συστημάτων, που βασίζονται στη διαλυτοποίηση, γίνεται προσπάθεια αύξησης της θερμοδυναμικής διαλυτότητας κορεσμού. Τα συστήματα, τα οποία προκαλούν υπερκορεσμό, σε αντίθεση με αυτά, τα οποία βασίζονται στη διαλυτοποίηση:

- α. οδηγούν σε αύξηση της ελεύθερης συγκέντρωσης του φαρμάκου ενδοαυλικά και
- β. δεν προϋποθέτουν τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων διαλυτοποιητικών παραγόντων, κάτι, το οποίο, ίσως, έχει ευεργετικές συνέπειες, ως προς το βάρος της Φ/Μ ή/και την τοξικότητα.

### *A.3.3 Υπερκορεσμός που προκαλείται από τη διαβάθμιση του pH κατά μήκος του ΓΕ αυλού*

Εξαιτίας της διαβάθμισης του pH στο ΓΕ αυλό κατά τη διαπεπτική περίοδο (pH 1,5-2 στο στομάχο vs. pH 5-8 στο λεπτό έντερο), η διαλυτότητα κορεσμού των ασθενών βάσεων στο στόμαχο (κυρίως σε ιονισμένη μορφή) υπερβαίνει την αντίστοιχη διαλυτότητα κορεσμού στο λεπτό έντερο (κυρίως σε μη ιονισμένη μορφή). Κατ' επέκταση, η διάλυση των ελάχιστα διαλυτών στο νερό ασθενών βάσεων στο στομάχο και η μεταφορά τους στο λεπτό έντερο μπορεί να οδηγήσει σε υπέρκορες συγκεντρώσεις και σε αυξημένη ροή μέσου του εντερικού επιθηλίου (Brouwers et al. 2009).

Ο υπερκορεσμός λόγω διαβάθμισης του pH κατά μήκος του ΓΕ αυλού μπορεί να μεγιστοποιηθεί με τη χρήση Φ/Μ, η οποία βελτιώνει τη διάλυση στα γαστρικά υγρά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ελάχιστα διαλυτή στο νερό ιτρακοναζόλη. Η ιτρακοναζόλη ( $pK_a$  συζυγούς οξέος βάσης 4) έχει περιορισμένο ρυθμό διάλυσης και θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού ακόμη και σε πολύ όξινα μέσα, με αποτέλεσμα η απορρόφησή της να καθίσταται προβληματική. Το εμπορικό σκεύασμα

Sporanox<sup>®</sup>, αλλά και οι μήτρες διαταγμένου μεσοπορώδους οξειδίου του πυριτίου (Κεφ. Α.3.1), βελτιώνουν το γαστρικό ρυθμό διάλυσης της ιτρακοναζόλης και δημιουργούν υπέρκορες συγκεντρώσεις αυτής, ακόμη και στο στόμαχο. Παρόμοια, οι Miller et al. (2008a) ανέπτυξαν μια στερεή διασπορά της ιτρακοναζόλης σε μια εντερική μήτρα βασιζόμενη σε ένα ανιονικό συμπολυμερές μεθακρυλικού οξέος και αιθυλο-ακρυλικού εστέρα (Eudragit<sup>®</sup> L100-55). Εξαιτίας της εξαρτώμενης από το pH διάλυσης της μήτρας, η ιτρακοναζόλη αποδεσμεύτηκε σε υπέρκορες συγκεντρώσεις μετά τη μεταφορά στο έντερο. Ενσωμάτωση του πολυμερούς Carborol<sup>®</sup> 974P, που αυξάνει το ιξώδες ενός διαλύματος, ως παράγοντα σταθεροποίησης οδήγησε σε διατήρηση του υπερκορεσμού (Miller et al. 2008b).

Σε περιπτώσεις, αυξημένου pH στο στόμαχο, όπως σε περιπτώσεις υποχλωρδρίας ή κατά τη λήψη αντιόξινων ή αναστολέων της αντλίας πρωτονίων, η διάλυση των ασθενών βάσεων στο στόμαχο και κατ' επέκταση ο παρατηρούμενος υπερκορεσμός στο λεπτό έντερο επηρεάζονται αρνητικά. Για παράδειγμα, η απορρόφηση της ασθενούς βάσης αταζαναβίρης ( $pK_a$  συζυγούς οξέος βάσης 4,7), που είναι αναστολέας της πρωτεάσης του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), μειώθηκε σημαντικά κατά τη συγχορήγησή της με τον αναστολέα της αντλίας πρωτονίων λανσοπραζόλη (Tomilo et al. 2006). Επίσης, η μείωση της απορρόφησης της ιτρακοναζόλης από το εμπορικό σκεύασμα Sporanox<sup>®</sup> σε ασθενείς με επίκτητη ανοσοανεπάρκεια (AIDS), συνήθως, σχετίζεται με υποχλωρδρία (Lim et al. 1993, Willems et al. 2001). Για την αποφυγή της επίδρασης του pH στην απορρόφηση των ασθενών βάσεων έχουν αναπτυχθεί Φ/Μ, οι οποίες δεν επηρεάζονται από το pH. Με αυτό το σκεπτικό, η αποδέσμευση της ιτρακοναζόλης από μήτρα διαταγμένου μεσοπορώδους διοξειδίου του πυριτίου είναι ελπιδοφόρα, διότι επιτυγχάνονται υπέρκορες συγκεντρώσεις ιτρακοναζόλης όχι μόνο σε όξινα μέσα, αλλά, επίσης, σε υγρό, το οποίο προσομοιώνει τα περιεχόμενα του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο (FaSSIF), σε αντίθεση με την αποδέσμευση από το εμπορικό σκεύασμα Sporanox<sup>®</sup> (Mellaerts et al. 2008).

Οι Six et al. (2005) παρατήρησαν διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των *in vitro* πειραμάτων διάλυσης σε όξινο μέσο και της *in vivo* απορρόφησης τεσσάρων στερεών διασπορών της ιτρακοναζόλης. Χαρακτηριστικά αναφέρουν ότι η μεγαλύτερη αποδέσμευση και ο μεγαλύτερος υπερκορεσμός στο όξινο μέσο οδηγούν σε

διαφορετικούς ρυθμούς επανακρυστάλλωσης στο λεπτό έντερο και σε μειωμένη τιμή  $C_{max}$  ή/και  $AUC$ . Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική, διότι εάν πράγματι ισχύει και ενδοαυλικά, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν προσομοιώνεται η αλλαγή του pH κατά μήκος του ΓΕ αυλού για την εκτίμηση της διάρκειας του υπερκορεσμού. Επιπρόσθετα, με βάση αυτήν την παρατήρηση, ίσως, είναι αναγκαία η μελέτη απευθείας του υπερκορεσμού που επιτυγχάνεται στο λεπτό έντερο, αντί αυτού που επιτυγχάνεται στο στόμαχο.

#### *A.3.4 In vitro μέθοδοι για την εκτίμηση της επίτευξης και διατήρησης υπερκορεσμού*

Όταν στόχος της *in vitro* μελέτης του υπερκορεσμού είναι η διερεύνηση του ρόλου των εκδόχων μιας Φ/Μ στη διατήρηση του υπερκορεσμού, τα έκδοχα μπορούν να συμπεριληφθούν είτε στη Φ/Μ είτε στο υγρό μέσο. Δεδομένου ότι οι υπάρχουσες μέθοδοι προσδιορισμού της συγκέντρωσης παρουσία σωματιδίων είναι σε πολλά θέματα προβληματική (Juenemann et al. 2011), ιδιαίτερης σημασίας για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων είναι ο αξιόπιστος διαχωρισμός του στερεού από το διάλυμα. Οι πιο συνήθεις μέθοδοι διαχωρισμού στερεού από το υγρό μέσο είναι η διήθηση και η φυγοκέντρωση. Σε περιπτώσεις, όμως, που μελετώνται νανοσωματίδια, π.χ. για την πιθανότητα δημιουργίας υπέρκορου διαλύματος, ο διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί μόνο με υπερφυγοκέντρωση ή με διήθηση με τη χρήση ηθμών με μέγεθος πόρων μερικά νανόμετρα (Matteucci et al. 2007, Overhoff et al. 2008).

Οι Bevernage et al. (2010) μελέτησαν τον υπερκορεσμό σε μέσα, τα οποία προσομοιώνουν τα περιεχόμενα του εντερικού αυλού κατά τη διαπεπτική περίοδο (FaSSIF) και κατά την περίοδο πέψης (FeSSIF), και σε συνενωμένα δείγματα ανθρώπινων εντερικών υγρών, που αναρροφήθηκαν μετά τη χορήγηση 250 mL νερού (διαπεπτική περίοδος), μετά τη χορήγηση 400 mL Ensure plus<sup>®</sup> και 200 mL νερού (περίοδος πέψης) και μετά τη χορήγηση 300 mL Scandishake Mix<sup>®</sup> και 300 mL νερού (περίοδος πέψης μετά τη χορήγηση υπερωσμωτικού γεύματος), χρησιμοποιώντας διάφορες ελάχιστα διαλυτές στο νερό δραστικές ουσίες ως ουσίες-πρότυπα. Ανάμεσα στις ουσίες, που μελέτησαν, υπήρχαν δύο ασθενείς βάσεις, η ιτρακοναζόλη και η ετραβιρίνη [ $pK_a$  συζυγούς οξέος βάσης <3] (Weuts και Van Dycke, 2011). Ο υπερκορεσμός μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο solvent-shift

(αλλαγή διαλύτη). Οι ερευνητές βασίστηκαν σε αυτή τη μέθοδο, διότι είναι εργαστηριακά εύχρηστη και σε παλιότερη μελέτη δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα του υπερκορεσμού της ιτρακοναζόλης με τη χρήση αυτής της μεθόδου και της μεθόδου pH-shift [αλλαγής pH] (Mellaerts et al. 2008). Για τη μέθοδο solvent-shift, αρχικά, παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης των δραστικών ουσιών σε οργανικούς διαλύτες [DMSO και DMA (διμεθυλοακεταμίδιο)]. Τα διαλύματα παρακαταθήκης προστίθενται σε προσομοιωμένα ενδοαυλικά υγρά ή/και σε εντερικά υγρά (π.χ. 1,5 % v/v στην περίπτωση του DMSO και 1 % v/v στην περίπτωση του DMA), έτσι ώστε η θεωρητική συγκέντρωση του φαρμάκου στο μέσο να είναι ~20 φορές μεγαλύτερη από τη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για ορισμένο χρονικό διάστημα.

Οι Bevernage et al. (2010) διαπίστωσαν ότι στο FaSSIF, το κλάσμα υπερκορεσμού της ιτρακοναζόλης μειώθηκε από 18, 15 min μετά την έναρξη της επώασης, σε 10, 2 h μετά την έναρξη της επώασης. Το κλάσμα υπερκορεσμού της ετραβιρίνης μειώθηκε από 20, 15 min μετά την έναρξη της επώασης, σε 6, 2 h μετά την έναρξη της επώασης. Στο FeSSIF, το κλάσμα υπερκορεσμού της ιτρακοναζόλης παρέμεινε 19 σε όλη σχεδόν τη διάρκεια της επώασης. Αντίθετα, το κλάσμα υπερκορεσμού της ετραβιρίνης στο FeSSIF μειώθηκε από 17, 15 min μετά την έναρξη της επώασης, σε 4, 2 h μετά την έναρξη της επώασης. Λαμβάνοντας υπόψη την αυξημένη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της ετραβιρίνης στο FeSSIF από το FaSSIF, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η μικρότερη διάρκεια της κατάστασης υπερκορεσμού στο FeSSIF αντιστοιχούσε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ετραβιρίνης στο διάλυμα: 15 min μετά την έναρξη της επώασης, η συγκέντρωση της ετραβιρίνης στο FaSSIF ήταν 40 μM, ενώ στο FeSSIF ήταν 248 μM.

Μια εναλλακτική προσέγγιση, της οποίας η χρήση αυξάνεται τα τελευταία χρόνια, είναι η *in situ* μέτρηση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας με τη χρήση οπτικών ινών και μέτρηση της απορρόφησης UV/Vis. Αυτή η προσέγγιση μέχρι σήμερα έχει εφαρμοσθεί στη δοκιμασία μέτρησης του ενδογενούς ρυθμού διάλυσης σε μικροκλίμακα με τη διάταξη περιστρεφόμενου δίσκου (Berger et al. 2007, Avdeef και Tsinman, 2008), της διάλυσης σκόνης (Tsinman et al. 2009), του μεγέθους των σωματιδίων με βάση δεδομένα από ρυθμό διάλυσης (Avdeef et al. 2009), και του



προσδιορισμού της καθίζησης με *in vitro* διατάξεις, που προσομοιώνουν το σύστημα στόμαχο-έντερο (Polster et al. 2010) [Κεφ. Α.4]. Αξίζει, όμως, να αναφερθεί ότι οι van Eerdenbrugh et al. (2011) διαπίστωσαν ότι σε διαλύματα, τα οποία περιείχαν πολύ μικρού μεγέθους σωματίδια (μικρότερα από την τάξη των μικρομέτρων) φελοδιπίνης, το φάσμα UV επηρεάστηκε από την απορρόφηση των σωματιδίων και από την αθροιστική επίδραση της απορρόφησης των διαλυμένων μορίων και της σκέδασης της ακτινοβολίας λόγω της παρουσίας των σωματιδίων.

Για την ποσοτικοποίηση του υπερκορεσμού (εξισώσεις Α.6 και Α.7), οι παρατηρούμενες συγκεντρώσεις είναι απαραίτητο να συγκρίνονται με τη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού, η οποία προσδιορίστηκε ακριβώς στο ίδιο μέσο. Η σύσταση του μέσου και οι μεταβολές που αυτό υφίσταται σε συνάρτηση με το χρόνο, η παρουσία εκδόχων και η επίδραση συν-διαλυτών δεν επηρεάζουν μόνο το βαθμό υπερκορεσμού, αλλά και τη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού μιας δραστικής ουσίας. Ο προσδιορισμός της θερμοδυναμικής διαλυτότητας κορεσμού στο μέσο, γίνεται, συνήθως, με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης παρουσία περίσσειας σκόνης με τη θερμοδυναμικά σταθερή κρυσταλλική δομή [Κεφ. Α.2.2] (Brouwers et al. 2009).

Οι Box et al. (2006) και οι Box και Comer (2008) έχουν προτείνει τη μέθοδο CheqSol<sup>®</sup> ως μια εναλλακτική και γρήγορη μέθοδο για την εκτίμηση του υπερκορεσμού. Με αυτήν την ποτενσιομετρική τεχνική μετράται η κινητική διαλυτότητα (Κεφ. Α.2.2) και στη συνέχεια προσδιορίζεται η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού. Με αυτήν την τεχνική έχουν κατηγοριοποιηθεί 84 μόρια σύμφωνα με το κλάσμα υπερκορεσμού στο νερό. Τα πέντε μόρια με τη μεγαλύτερη τιμή (>40) ήταν η λοπεραμίδη, η γλιπιζίδη, το μεφαιναμικό οξύ, η πιροξικάμη και η δικλοφαινάκη. Για 44 μόρια, το κλάσμα υπερκορεσμού ήταν από 1,4 ως 40. Για τα υπόλοιπα μόρια, το υπέρκορο κλάσμα ήταν μικρότερο από 1,4. Μερικά από αυτά τα μόρια ήταν ελάχιστα διαλυτά και ήταν φανερό από τα πειραματικά δεδομένα, ότι είχαν μικρή τάση να δημιουργούν υπέρκορα διαλύματα. Επίσης, μόρια με μεγαλύτερη διαλυτότητα είχαν κλάσμα υπερκορεσμού μικρότερο από 1,4 (Box and Comer, 2008).

#### A.4 Καθίζηση

Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs ενός υπέρκορου συστήματος είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs του συστήματος σε κατάσταση κορεσμού (θερμοδυναμική ισορροπία). Για αυτόν το λόγο το σύστημα είναι ασταθές και τείνει να επιστρέψει στην κατάσταση με τη χαμηλότερη τιμή της ελεύθερης ενέργειας, η οποία είναι η κατάσταση κορεσμού. Στην περίπτωση των διαλυμάτων των δραστικών ουσιών, μπορούμε να θεωρήσουμε, ότι η πίεση ( $P$ ) και η θερμοκρασία ( $T$ ) του συστήματος είναι σταθερές και ως αποτέλεσμα, η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs να αντανακλά σε μεταβολή του χημικού δυναμικού του διαλύματος της δραστικής ουσίας. Η αλλαγή στο χημικό δυναμικό του διαλύματος της δραστικής ουσίας μπορεί να συντελεστεί με καθίζηση αυτής (Brouwers et al. 2009).

Το φαινόμενο της καθίζησης μπορεί να χωριστεί σε δύο διαδικασίες, τη δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων (Sugano, 2009). Σύμφωνα με την κλασική θεωρία δημιουργίας πυρήνων κρυστάλλωσης [classical nucleation theory (CNT)], ο ρυθμός αύξησης του αριθμού των πυρήνων μπορεί να εκφραστεί ως εξής (Liu, 1999; Lindfors et al. 2008):

$$\frac{dN_{nc}}{dt} = \beta D_{mono} (N_A C_{aq})^2 \left[ \frac{k_B T}{\gamma} \right]^{1/2} \ln \left( \frac{C_{aq}}{(C_S)_0} \right) \times \exp \left( - \frac{16\pi}{3} \left( \frac{\gamma}{k_B T} \right)^3 \left( \frac{v_m}{\ln \left( \frac{C_{aq}}{(C_S)_0} \right)} \right)^2 \right) \quad (\text{εξ. A.8})$$

όπου  $N_{nc}$  είναι ο αριθμός των πυρήνων,  $N_A$  ο αριθμός Avogadro,  $C_{aq}$  είναι η συγκέντρωση της ελεύθερης μορφής της δραστικής ουσίας στην υδατική φάση (όχι του διαλυτοποιημένου μέρους),  $(C_S)_0$  είναι η ενδογενής διαλυτότητα της προς καθίζηση (ελεύθερης) μορφής,  $k_B$  η σταθερά Boltzman,  $T$  η θερμοκρασία του διαλύματος,  $\gamma$  η επιφανειακή τάση,  $v_m$  είναι ο όγκος του μορίου,  $D_{mono}$  είναι ο συντελεστής διάχυσης της ελεύθερης μορφής της δραστικής ουσίας, και  $\beta$  είναι μια σταθερά, η οποία καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, όπως ο αριθμός ξένων προς τη δραστική ουσία σωματιδίων, τα οποία μπορεί να συμμετάσχουν στη δημιουργία ετερογενών πυρήνων κρυστάλλωσης, και η πιθανότητα προσέγγισης ενός μορίου στον πυρήνα.

Αν θεωρηθεί η καθίζηση ως μια αντίστροφη διαδικασία της διάλυσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η παρακάτω εξίσωση για την περιγραφή της καθίζησης στα περιεχόμενα του λεπτού εντέρου (Sugano, 2009):

$$\frac{dX_{nc,i}}{dt} = 4\pi r_p^2 \frac{D_{eff}}{h} (S_b - C_b) \quad (\text{εξ. A.9})$$

$$r_p = \left( \frac{4}{3\pi} \frac{X_{nc}}{\rho} \right)^{1/3} \quad (\text{εξ. A.10})$$

όπου  $X_{nc,i}$  είναι η ποσότητα των σωματιδίων (κατά βάρος ή γραμμομοριακή) που δημιουργήθηκαν σε μια χρονική περίοδο,  $r_p$  η ακτίνα του σωματιδίου σε χρονική στιγμή  $t$ ,  $D_{eff}$  ο δρών συντελεστής διάχυσης (π.χ. σε μέσο με μικύλλια χολικών),  $\rho$  η πυκνότητα,  $h$  το πάχος της στιβάδας διάχυσης,  $C_b$  το άθροισμα των συγκεντρώσεων του ελεύθερου μονομερούς και του συνδεδεμένου με τα μικκύλια χολικών μόριου, και  $S_b$  είναι η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στα μικκύλια χολικών (Sugano, 2009).

#### *A.4.1 Εκτίμηση ενδοαυλικών συγκεντρώσεων και πιθανής καθίζησης στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου λιπόφιλων δραστικών ουσιών με ασθενώς αλκαλικές ιδιότητες*

Οι ασθενείς βάσεις αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό των από του στόματος χορηγούμενων δραστικών ουσιών (Paulekuhn et al. 2007) και διαλύονται ευκολότερα σε όξινες τιμές pH εξαιτίας των χαρακτηριστικών ιονισμού τους. Ανάλογα με τη λιποφιλία της και την ποσότητα της χορηγούμενης δόσης, η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στα γαστρικά υγρά είναι πιθανό να υπερβεί τη διαλυτότητα κορεσμού της στα υγρά του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου, με αποτέλεσμα η δραστική ουσία, μόλις βρεθεί στο περιβάλλον του λεπτού εντέρου, να καθιζήσει. Αυτό είναι πιθανότερο να συμβεί κατά τη διαπεπτική περίοδο. Η καθίζηση στα υγρά του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου αναμένεται να επηρεάσει το ρυθμό της απορρόφησης και είναι πιθανό να αυξήσει τη μεταβλητότητά της. Η εκτίμηση των ενδοαυλικών συγκεντρώσεων και της πιθανής καθίζησης στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου στα πρώτα στάδια της διαδικασίας ανάπτυξης των φαρμάκων

διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη μιας λιπόφιλης δραστικής ουσίας με ασθενώς αλκαλικές ιδιότητες.

### *In silico μέθοδοι*

Οι ενδοαυλικές συγκεντρώσεις λιπόφιλων ασθενών βάσεων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου μετά από *per os* χορήγηση κατά τη διαπεπτική περίοδο έχουν εκτιμηθεί είτε συνδυάζοντας τη διάλυση με την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων (Sugano 2010, Shono et al. 2011, Arnold et al. 2011), είτε, σε περίπτωση χορήγησης υγρών Φ/Μ, συνδυάζοντας τη δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης με την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων (Carlert et al. 2010).

Οι Carlert et al. (2010), βασιζόμενοι στην κλασική θεωρία κρυστάλλωσης, εκτίμησαν τη γραμμικότητα της δόσης ως προς τη μέγιστη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο πλάσμα ( $C_{max}$ ) και της δόσης ως προς την έκταση της απορρόφησης ( $AUC$ ) στους ανθρώπους. Ο Sugano (2010) χρησιμοποίησε μια μηχανιστική προσέγγιση, όπου οι θεωρητικές εξισώσεις της διάλυσης, της καθίζησης (δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης), της διαπέρασης του εντερικού τοιχώματος και της διάβασης του ΓΕ αυλού συνδυάστηκαν σε ένα ενοποιημένο, θεωρητικό μοντέλο, όπου λαμβάνονταν επιπρόσθετα υπόψη οι ιδιότητες των μορίων της δραστικής ουσίας και της Φ/Μ, καθώς και η φυσιολογία του ΓΕ αυλού. Σύμφωνα με τα παραπάνω, όταν η δραστική ουσία έχει ασθενώς αλκαλικές ιδιότητες, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο τύπους, την ελεύθερη βάση (για την οποία υποτίθεται μερική διάλυση κατά την παραμονή στο στομάχο) και το αντίστοιχο άλας (για το οποίο υποτίθεται πλήρης διάλυση κατά την παραμονή στο στομάχο). Με αυτό το μοντέλο προσομοιώθηκε το απορροφούμενο κλάσμα ( $F_a$ ) στον άνθρωπο μιας σειράς ελεύθερων ανδρών ασθενών βάσεων (Sugano, 2010). Χρησιμοποιώντας μια παρόμοια μηχανιστική προσέγγιση και το λογισμικό STELLA<sup>®</sup> εκτιμήθηκε επιτυχώς η *in vivo* συμπεριφορά της νελφίναβιρης κατά τη διαπεπτική περίοδο (Shono et al. 2011).

Τέλος, πιο πρόσφατα, οι Arnold et al. (2011) ανέπτυξαν ένα θεωρητικό μαθηματικό μοντέλο για την περιγραφή της κινητικής του σχηματισμού πυρήνων κρυστάλλωσης και αύξησης του μεγέθους των κρυστάλλων, που βασίζεται στο νόμο της δύναμης (power law). Σε αυτό το μοντέλο λήφθηκε υπόψη η μεταφορά από τα γαστρικά

περιεχόμενα προς τα εντερικά περιεχόμενα. Διέκριναν την όλη διαδικασία σε 4 φάσεις: (1) από την αρχή μέχρι την έναρξη της δημιουργίας πυρήνων κρυστάλλωσης, (2) από την έναρξη της δημιουργίας πυρήνων κρυστάλλωσης μέχρι το τέλος της μεταφοράς του μέσου, (3) από το τέλος της μεταφοράς του μέσου μέχρι την έναρξη της αύξησης του μεγέθους των σωματιδίων, και (4) από την έναρξη της αύξησης του μεγέθους των σωματιδίων μέχρι το άπειρο (Arnold et al. 2011).

### *In vitro μέθοδοι*

Έχουν προταθεί διάφορες *in vitro* διατάξεις για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων των λιπόφιλων, ασθενών βάσεων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου και της πιθανής καθίζησης αυτών, μετά από *per os* χορήγηση κατά τη διαπεπτική περίοδο. Αυτές οι διατάξεις αποτελούνται από ένα, ή συνηθέστερα, από πολλαπλά διαμερίσματα.

Οι Kobayashi et al. (2001) ανέπτυξαν μια διάταξη, στην οποία λαμβανόταν υπόψη η διάλυση της στερεής Φ/Μ της δραστικής ουσίας και η μεταβολή του pH κατά μήκος του ΓΕ αυλού. Συγκεκριμένα, 3 mg στερεής Φ/Μ αλμπενταζόλης, ενός ανθελμινθικού με ασθενώς βασικές ιδιότητες [ $pK_{a1}$  συζυγούς οξέος 2,68 και  $pK_{a2}$  συζυγούς οξέος 11,83] (Galia et al. 1999) τοποθετήθηκαν σε έναν υάλινο περιέκτη, ο οποίος προσομοίωνε το στόμαχο κατά τη διαπεπτική περίοδο, και περιείχε 3 mL διαλύματος υδροχλωρικού οξέος, pH 1,0, εμπλουτισμένου με ηλεκτρολύτες και γλυκόζη. Η διαλυθείσα δραστική ουσία μεταφερόταν σε έναν άλλο υάλινο περιέκτη, ο οποίος προσομοίωνε το λεπτό έντερο κατά τη διαπεπτική περίοδο, και περιείχε 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος διφωσφορικών, pH 6,0, εμπλουτισμένου με ηλεκτρολύτες. Το pH στον περιέκτη, που προσομοίωνε το λεπτό έντερο, διατηρούταν σταθερό. Από το διαμέρισμα, που προσομοίωνε το λεπτό έντερο, το διάλυμα του φαρμάκου μεταφερόταν στην πλευρά-δότη ενός σάκου έγχυσης, στον οποίο είχε προσαρμοσθεί μια μικροσκοπική διαυγής μεμβράνη πολυκαρβονικών (Millicell-PCF). Πάνω σε αυτήν τη μεμβράνη και μεταξύ της πλευράς-δότη και της πλευράς-δέκτη υπήρχε μια μονοστιβάδα κυτταρικής σειράς Caco-2. Η δραστική ουσία διαπερνούσε τη μονοστιβάδα και συγκεντρωνόταν στην πλευρά-δέκτη. Η δειγματοληψία γινόταν στην πλευρά-δέκτη κάθε 5 min. Η μεταφορά των διαλυμάτων μεταξύ των υάλινων περιεκτών και του σάκου γινόταν με τη χρήση μιας

περισταλτικής αντλίας και με σωλήνες σιλικόνης. Με τη χρήση αυτής της *in vitro* διάταξης έγινε εφικτή η εκτίμηση του % ποσοστού της δόσης που απορροφήθηκε, μετά την από του στόματος χορήγησή της στον άνθρωπο (Kobayashi et al. 2001).

Οι Kostewicz et al. 2004 ανέπτυξαν μια διάταξη για να προσομοιώσουν τη μεταφορά της δραστικής ουσίας από το στομάχο προς το λεπτό έντερο, που περιελάμβανε δύο διαμερίσματα. Το πρώτο περιείχε υγρό, το οποίο προσομοιώνει τα περιεχόμενα του στομάχου κατά τη διαπεπτική περίοδο (SGF, pH 2,1), και το δεύτερο περιείχε 500 mL FaSSIF ή FeSSIF, ανάλογα με το αν προσομοιωνόταν η διαπεπτική περίοδος ή η περίοδος πέψης, αντίστοιχα. Η ανάδευση των περιεχομένων του υγρού στο διαμέρισμα-δέκτη γινόταν με τη βοήθεια της διάταξης του περιστρεφόμενου περυσίου (USP II, dissolution apparatus). Διάλυμα του φαρμάκου με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας μεταφερόταν από το πρώτο στο δεύτερο διαμέρισμα και η πιθανή καθίζηση της δραστικής ουσίας μελετήθηκε μέσω μέτρησης συγκεντρώσεων δραστικής ουσίας στο δεύτερο διαμέρισμα σε σχέση με χρόνο. Με αυτήν τη διάταξη μελετήθηκε η καθίζηση τριών δυσδιάλυτων ασθενών βάσεων, της διπυριδαμόλης, της BIBU 104 XX και της BIMT 17 BS. Με μεταβολή των πειραματικών συνθηκών έγινε δυνατή η μελέτη της επίδρασης των υδροδυναμικών συνθηκών, του ρυθμού μεταφοράς και της σύστασης των μέσων, που προσομοιώνουν το εντερικό υγρό στην καθίζηση των παραπάνω δραστικών ουσιών (Kostewicz et al. 2004). Τα αποτελέσματα με τη διάταξη των Kostewicz et al. (2004) έδειξαν ότι και οι τρεις δραστικές ουσίες, που μελετήθηκαν, μπορούν να προκαλέσουν υπερκορεσμό των περιεχομένων του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο. Ο υψηλός βαθμός υπερκορεσμού, ο οποίος επιτεύχθηκε ακριβώς πριν από έναρξη της καθίζησης δεν μπορεί να προβλεφθεί με τα κλασσικά πειράματα διαλυτότητας και διάλυσης. Επιπρόσθετα, τα δεδομένα έδειξαν ότι ταχύς ρυθμός γαστρικής κένωσης μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη μέγιστη συγκέντρωση στο λεπτό έντερο, αλλά και σε γρηγορότερη έναρξη της καθίζησης, επειδή ο αριθμός των σχηματιζόμενων κρυστάλλων σε αυτήν την περίπτωση πιθανόν να είναι μεγάλος. Η καθίζηση θα συνοδεύεται από ταχύτατη μείωση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας. Για αυτόν το λόγο, η *in vivo* καθίζηση θεωρείται περισσότερο πιθανή όταν η δραστική ουσία μεταφέρεται γρήγορα από το στομάχο (Kostewicz et al. 2004). Τέλος, τα δεδομένα των Kostewicz et al. 2004 έδειξαν, ότι οι υδροδυναμικές συνθήκες στο έντερο συγκρινόμενες με άλλους παράγοντες, όπως ο ρυθμός γαστρικής κένωσης, το

pH των περιεχομένων του λεπτού εντέρου και τα επίπεδα των χολικών αλάτων, έχουν τη μικρότερη επίδραση στην καθίζηση.

Ένα μειονέκτημα του πειραματικού σχεδιασμού των Kostewicz et al. (2004) είναι, ότι στα πειράματα με τη διπυριδαμόλη χρησιμοποιήθηκαν υπερβολικά, για τις συνήθεις χορηγούμενες σε άνθρωπο δόσεις, μεγάλες συγκεντρώσεις στο γαστρικό διαμέρισμα (3 mg/mL). Ένα άλλο μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι η εν λόγω διάταξη δεν λάμβανε υπόψη τη διαδικασία της απορρόφησης και την ταυτόχρονη μεταφορά των περιεχομένων του λεπτού εντέρου προς το κατώτερο τμήμα του εντέρου.

Οι Carlert et al. (2010) και Arnold et al. (2011) χρησιμοποίησαν μια διάταξη παρόμοια με αυτή των Kostewicz et al. (2004) για να ελέγξουν τη χρησιμότητά της στην πρόβλεψη της ενδοαυλικής καθίζησης (Carlert et al. 2010) και για να ελέγξουν τη χρησιμότητα ενός νέου θεωρητικού μοντέλου στην περιγραφή παρόμοιων πειραματικών δεδομένων. Στην πρώτη περίπτωση, 100 mg AZD0865 (ασθενής βάση, Τάξη II με βάση το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης) διαλύθηκαν σε 250 mL SGF<sub>sp</sub> (USP 32-NF 27) και μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας σε 500 mL FaSSIF. Το πείραμα είχε διάρκεια 125 min. Συνέκριναν τα αποτελέσματα με *in vivo* δεδομένα σε πλάσμα μετά από χορήγηση διαλύματος AZD0865 διαφόρων συγκεντρώσεων σε υγιείς εθελοντές και κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι με την *in vitro* διάταξη οδηγήθηκαν σε υπερεκτίμηση της καθίζησης AZD0865 στον εντερικό αυλό. Στη δεύτερη περίπτωση (Arnold et al. 2011), ποσότητα διπυριδαμόλης διαλύθηκε σε 250 mL FaSSGF, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 3 mg/mL. Αυτό το διάλυμα μεταφέρθηκε με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας σε 500 mL FeSSIF-V2 με δύο διαφορετικούς ρυθμούς μεταφοράς. Το μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι χρησιμοποιήθηκε FeSSIF-V2 αντί FaSSIF-V2, αλλά οι συγγραφείς αναφέρουν, ότι το FeSSIF-V2 προκαλεί μικρότερη παρεμπόδιση στον XPT-C αναλυτή σωματιδίων (μετράει τον αριθμό, το σχήμα και το μέγεθος των σωματιδίων σε ένα διάλυμα και, έτσι, προσδιορίζει την ποσότητα των σωματιδίων ανά μονάδα όγκου διαλύματος) σε σχέση με το FaSSIF-V2. Χρησιμοποιώντας, λοιπόν, το λογισμικό EASY-FIT αποδείχτηκε ότι το θεωρητικό μοντέλο που αναπτύχθηκε για την περιγραφή της καθίζησης ήταν απόλυτα επαρκές για την περιγραφή των πειραματικών δεδομένων.

Οι Gu et al. (2005) χρησιμοποίησαν μια διάταξη με τέσσερα διαμερίσματα. Για την προσομοίωση των γαστρικών περιεχομένων υγιών ανθρώπων κατά τη διαπεπτική περίοδο τοποθετήθηκαν στο γαστρικό διαμέρισμα (διαμέρισμα 1) 250 mL διαλύματος υδροχλωρικού οξέος, pH 1,2. Το εντερικό διαμέρισμα (διαμέρισμα 2) περιείχε, πριν από την έναρξη του πειράματος, 250 mL FaSSIF, pH 5,5, που προσομοίωναν τα περιεχόμενα του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο. Η διάρκεια των πειράτων ήταν 2 h. Κατά την πρώτη ώρα, υπήρχε ροή από το διαμέρισμα 1 προς το διαμέρισμα 2 και το pH στο διαμέρισμα 2 παρέμενε σταθερό στην τιμή 5,5( $\pm 0.2$ ) με τη βοήθεια αυτόματου τιτλοδότη. Το αρχικό pH στο διαμέρισμα 2 παρέμενε 5,5, σύμφωνα με τους συγγραφείς, ώστε να προσομοιωθεί η χαμηλότερη τιμή pH του δωδεκαδάκτυλου (pH 5-7) σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή pH του κατώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου. Μετά το τέλος της πρώτης ώρας (ολοκλήρωση της μεταφοράς του διαλύματος από το διαμέρισμα 1 προς το 2), το pH στο διαμέρισμα 2 αυξήθηκε σταδιακά σε διάστημα 1 h στην τελική τιμή 6,5. Η σταδιακή αύξηση του pH μετά την ολοκλήρωση 1 h προσομοίωνε τη μεταφορά του περιεχομένου του δωδεκαδάκτυλου προς το κατώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου (pH νήστιδας 6-7). Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (2 h) υπήρχε μεταφορά μέσω από το διαμέρισμα 2 (εντερικό διαμέρισμα) προς το διαμέρισμα 3. Το διαμέρισμα 3 ήταν ένας ογκομετρικός κύλινδρος και προσομοίωνε την απορρόφηση της διαλυμένης δραστικής ουσίας. Ο ρυθμός ροής από το διαμέρισμα 1 προς το 2 ρυθμίστηκε σε 4,5 mL/min. Ο ρυθμός ροής από το διαμέρισμα 2 προς το διαμέρισμα 3 προσαρμόστηκε με βάση τη διαπερατότητα των προς εξέταση δραστικών ουσιών. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (2 h) ο ρυθμός ροής από ένα διαμέρισμα-δεξαμενή που περιείχε FaSSIF με pH 6,5, το διαμέρισμα 4, προς το διαμέρισμα 2 ήταν ίσος με το ρυθμό ροής από το διαμέρισμα 2 προς το 3 (Gu et al. 2005). Με αυτήν τη διάταξη εκτιμήθηκε η συμπεριφορά μιας δόσης διπυριδαμόλης (50 mg,  $pK_{a1}$  συζυγούς οξέος 6,0 και  $pK_{a2}$  συζυγούς οξέος 12,5) και δύο δόσεων κινναραζίνης (25 και 50 mg,  $pK_{a1}$  συζυγούς οξέος 1,95 και  $pK_{a2}$  συζυγούς οξέος 7,5) μετά από του στόματος χορήγηση κατά τη διαπεπτική περίοδο. Αποδείχτηκε ότι παρόλο που και οι δύο δραστικές ουσίες, στις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν, διαλύθηκαν πλήρως στο γαστρικό διαμέρισμα, όπου το pH ήταν χαμηλό, το ποσοστό καθίζησης στο εντερικό διαμέρισμα ήταν περίπου 36 % και 40 %, στην περίπτωση των 25 mg και 50 mg κινναραζίνης, αντίστοιχα, ενώ η καθίζηση, που παρατηρήθηκε στην περίπτωση της



διυριδαμόλης, ήταν λιγότερο από 10 % της αρχικής δόσης. Η διαφορά στο ποσοστό καθίζησης μπορεί να οφείλεται στη μικρότερη διαλυτότητα και κατά συνέπεια στο μεγαλύτερο βαθμό υπερκορεσμού της κινναραζίνης στο εντερικό διαμέρισμα.

Η διάταξη τεχνητού στομάχου-λεπού εντέρου (artificial stomach-duodenum, ASD) απαρτίζεται από δύο διαμερίσματα που αντιστοιχούν στο στόμαχο και στο λεπτό έντερο (Carino et al. 2006). Οι παράμετροι ρυθμίζονται έτσι, ώστε να προσομοιώνεται η φυσιολογία του σκύλου κατά τη διαπεπτική περίοδο. Αρχικά, το γαστρικό διαμέρισμα περιείχε 20 mL διαλύματος υδροχλωρικού οξέος [ $10^{-2}$  N ή  $10^{-4}$  N, ανάλογα με την τιμή γαστρικού pH (2 ή 4,5), που προσομοιωόταν]. Σε αυτά προστέθηκαν 50 mL νερού, που προσομοίωναν το υγρό, που συνοδεύει, συνήθως, τη Φ/Μ. Το εντερικό διαμέρισμα περιείχε, αρχικά, 30 mL υγρού, το οποίο προσομοίωνε τα εντερικά περιεχόμενα (SIF), αλλά ήταν τροποποιημένο για να χρησιμοποιηθεί στη διάταξη ASD (ASD-fasted SIF). Αυτό το μέσο περιείχε 5 mM ταυροχολικό νάτριο και 200 mL KCl σε 50 mM pH 6,5 ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Η μεταφορά των περιεχομένων από το διαμέρισμα-στόμαχο στο διαμέρισμα-δωδεκαδάκτυλο γινόταν με τη βοήθεια αντλίας και με βάση κινητική πρώτης τάξης με  $t_{1/2}=10$  min. Ο όγκος του μέσου στο διαμέρισμα-δωδεκαδάκτυλο παρέμενε σταθερός με τη βοήθεια μιας αντλίας κενού. Τα περιεχόμενα και των δύο διαμερισμάτων αναμιγνύονταν με μαγνητικούς αναδευτήρες. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, νέο μέσο αναπλήρωνε τα υπάρχοντα στα δύο διαμερίσματα. Καθόλη τη διάρκεια του πειράματος οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου και το pH του μέσου παρακολουθούνταν με τη βοήθεια οπτικών ινών και ηλεκτροδίων μέτρησης του pH, αντίστοιχα (Bhattachar et al. 2011).

Η δραστική ουσία LCX είναι μια αντικαρκινική υπό ανάπτυξη ασθενής βάση, Τάξης II στο σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης με  $pK_a$  συζυγούς οξέος μεταξύ 4 και 6 (Polster et al. 2010). Η LCX εξετάστηκε στη φάση I των κλινικών δοκιμών με τη χρήση καψακίων, τα οποία περιείχαν μίγμα αυτής με άμυλο. Η Φ/Μ χορηγήθηκε σε τέσσερις ασθενείς και παρατηρήθηκε εκτεταμένη δια- και ενδο-ατομική μεταβλητότητα. Η διάταξη ASD χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επίδρασης του pH του στομάχου στη διάλυση του φαρμάκου και στον υπερκορεσμό των περιεχομένων του δωδεκαδάκτυλου, καθώς και για τη διερεύνηση των δοσολογικών σχημάτων, τα οποία πιθανώς να μειώσουν τη μεταβλητότητα (Polster et

al. 2010). Με τη βοήθεια της τεχνολογίας ASD διαπιστώθηκε ότι η συγχορήγηση καψακίων, στα οποία η δραστική ουσία LCX ήταν εγκλεισμένη σε μια τροποποιημένη κυκλοδεξτρίνη (Captisol<sup>®</sup>), και Sprite<sup>®</sup> ήταν ο καταλληλότερος συνδυασμός για μελλοντικές κλινικές δοκιμές της ουσίας LCX (Polster et al. 2010).

Με τη διάταξη ASD μελετήθηκε η επίδραση του pH του στομάχου στην απορρόφηση μιας άλλης υπό ανάπτυξη δυσδιάλυτης ασθενούς λιπόφιλης βάσης υψηλής διαπερατότητας, της LY2157299 [ $pK_{a1}$  συζυγούς οξέος 4,34 και  $pK_{a2}$  συζυγούς οξέος 2,81] (Bhattachar et al. 2011). Με βάση τα *in vitro* δεδομένα, η χορήγηση μιας όξινης με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος Φ/Μ μπορεί να βελτιώσει την απορρόφηση προκαλώντας υπερκορεσμό των περιεχομένων του λεπτού εντέρου (Bhattachar et al. 2011). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώθηκαν σε σκύλους ράτσας beagle, των οποίων το pH στο στόμαχο είχε τροποποιηθεί, πριν από τη χορήγηση της LY2157299, με χρήση πενταγαστρίνης ή ρανιτιδίνης. Γενικά, η διάταξη ASD επιτρέπει τη μελέτη της επίδρασης της διάλυσης στο στόμαχο στη θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού στο δωδεκαδάκτυλο, καθώς και στις απεικονίσεις pH, οι οποίες σχετίζονται με διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες και φορείς Φ/Μ. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι το δωδεκαδάκτυλο είναι το μόνο διαμέρισμα απορρόφησης, που αντιπροσωπεύεται στη διάταξη ASD και δεν έχει σχεδιαστεί για προσομοίωση της διαπερατότητας, είχε ως αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση της έκτασης των διαφορών έκθεσης στη δραστική LY2157299, εξαιτίας της διαμόρφωσης του pH του στομάχου λόγω χορήγησης πενταγαστρίνης ή ρανιτιδίνης (Bhattachar et al. 2011).

Οι Carlert et al. (2010) δοκίμασαν μια διάταξη αποτελούμενη από ένα διαμέρισμα. Αρχικά, η υπό ανάπτυξη ασθενής βάση AZD0865 ( $pK_a$  συζυγούς οξέος 6,1) διαλύθηκε σε φορέα με φαινόμενο pH 3 αποτελούμενο από PEG400 και αιθανόλη. Στη συνέχεια, προστέθηκε συμπυκνωμένο FaSSIF, έτσι ώστε στιγμιαία να επιτυγχάνονται συγκέντρωση χολικών αλάτων και pH αντίστοιχες του FaSSIF. Αυτή η διαδικασία είχε ως στόχο να προσομοιώσει τη σύσταση των ΓΕ περιεχομένων και τις συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου σε σχέση με το χρόνο καλύτερα από τα διαμερισματικά μοντέλα μεταφοράς. Με αυτήν τη διάταξη μελετήθηκε ο ρυθμός καθίζησης της AZD0865 θεωρώντας διάφορες ενδοαυλικές υδροδυναμικές συνθήκες, οι οποίες προσομοιώθηκαν με το

περιστρεφόμενο περύγιο και την οριζόντια ανακίνηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν υπερεκτίμηση της *in vivo* καθίζησης. Με βάση αυτήν τη μελέτη διαπιστώθηκε, επίσης, ότι οι υδροδυναμικές συνθήκες είναι σημαντικός παράγοντας καθίζησης (Carlert et al. 2010).

#### A.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Παρά τη θεωρητικά αυξημένη πιθανότητα καθίζησης των λιπόφιλων ασθενών βάσεων μετά από *per os* χορήγηση κατά τη διαπεπτική περίοδο, και την εκτεταμένη μέχρι σήμερα δραστηριότητα για την *in vitro* εκτίμησή της, τα δημοσιευμένα δεδομένα που επιβεβαιώνουν τη σημασία αυτής *in vivo*, είναι εξαιρετικά περιορισμένα. Επιπρόσθετα, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι μια λιπόφιλη ασθενής βάση, η οποία βρίσκεται στο στάδιο της ανάπτυξης, δεν παρουσιάζει ενδοαυλική καθίζηση, σε βαθμό, που να επηρεάζεται η διαδικασία της απορρόφησης, παρά τις αντίθετες εκτιμήσεις με βάση *in vitro* δεδομένα (Carlert et al. 2010).

Ένα πρόβλημα τόσο για τα θεωρητικά μοντέλα, όσο και για τις *in vitro* διατάξεις, που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα για την πρόβλεψη της ενδοαυλικής συμπεριφοράς λιπόφιλων ασθενών βάσεων (Κεφ. Α.4), είναι ότι η χρησιμότητά τους έχει αξιολογηθεί έμμεσα, για παράδειγμα με τη χρήση δεδομένων στο πλάσμα ή φαρμακοκινητικών παραμέτρων σε ζώα ή ανθρώπους και όχι με τη χρήση ενδοαυλικών δεδομένων σε ανθρώπους. Επιπρόσθετα, με εξαίρεση μερικά θεωρητικά μοντέλα (Carlert et al. 2010, Shono et al. 2011), τέτοια αξιολόγηση βασίζεται στην πρόβλεψη της έκτασης της απορρόφησης (*AUC*) ή στο % ποσοστό απορρόφησης της δόσης. Ωστόσο, οι ενδοαυλικές συγκεντρώσεις και πιθανή καθίζηση των λιπόφιλων (υψηλής διαπερατότητας) ασθενών βάσεων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου επηρεάζουν πρωτίστως την αρχική και δευτερευόντως την ολική έκθεση του ανθρώπου στο φάρμακο. Η ολική έκθεση του ανθρώπου στο φάρμακο επηρεάζεται, κυρίως, από την επάρκεια της διάλυσης της δόσης. Έτσι, είναι απαραίτητη η επικύρωση των θεωρητικών μοντέλων και των σχετικών *in vitro* διατάξεων.

Πρώτος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός της καθίζησης ασθενών βάσεων και του υπερκορεσμού των περιεχομένων του αυλού του

λεπτού εντέρου υγιών ενηλίκων κατά τη διαπεπτική περίοδο μετά την απλή χορήγηση δύο φαρμακολογικά δραστικών ασθενών βάσεων, που ανήκουν στην Τάξη II του Συστήματος Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης, της διπυριδαμόλης και της κετοκοναζόλης.

Η καθίζηση ποσοτικοποιήθηκε με βάση το κλάσμα καθίζησης,  $\pi$  ( $0 \leq \pi \leq 1$ ), το οποίο υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\pi = 1 - \frac{C}{C_t} \quad (\text{εξ. A.11})$$

όπου  $C$  είναι η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο διάλυμα και  $C_t$  είναι η συνολική ποσότητα της δραστικής ουσίας (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) ανά μονάδα όγκου.

Δεύτερος στόχος ήταν η ανάπτυξη μιας *in vitro* μεθοδολογίας, με την οποία αναπαράγονται οι ενδοαυλικές συγκεντρώσεις και η καθίζηση, που παρατηρήθηκαν ενδοαυτικά, για τη διπυριδαμόλη και την κετοκοναζόλη.

Τέλος, ο τρίτος στόχος ήταν η πρόβλεψη της ενδοαυλικής καθίζησης δύο υπό ανάπτυξη λιπόφιλων ασθενών βάσεων, που κατατάσσονται στην Τάξη II του Συστήματος Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης, των AZD0865 και SB705498, με βάση την αναπτυχθείσα *in vitro* μεθοδολογία και υπάρχοντα δεδομένα στο πλάσμα υγιών εθελοντών.

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η φαρμακολογική δράση και η εφάπαξ δόση των μορίων, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον Πίνακα Α.2.

**Πίνακας Α.2:** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, φαρμακολογική δράση και εφάπαξ δόση των ασθενών βάσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Δραστική ουσία	Διπυριδαμόλη	Κετοκοναζόλη	AZD0865	SB705498
Χρώμα	Κίτρινο	Άσπρο	Άσπρο*	Γκρί-Άσπρο (Off-white)*
Σχετική μοριακή μάζα	504,6	531,4	366,7*	429,2*
$pK_a$ συζυγούς οξέος	5,7-6,4**	2,94 και 6,51**	6,1*	4,38*
Συντελεστής λιποφιλίας ( $\log P$ )	2,74 και 4,90**	4,45**	4,2*	3,6*
Φαρμακολογική δράση	Αντιαιμοπεταλιακή***	Αντιμυκητιασική***	Αναστολή αντλίας πρωτονίων*	Ανταγωνιστική για υποδοχείς βανιλλοειδών (TRPV)*
Εφάπαξ δόση (mg)	25 και 75***	200***	-	-

\* Αρχείο προμηθευτή

\*\* Vertzoni et al. *Pharm Res.* 2007

\*\*\* Εθνικό Συνταγολόγιο 2007, Ε.Ο.Φ., Αθήνα

## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### B.1 Υλικά-Όργανα

- Αναδευτήρας κεφαλής model RW 20 DZM, IKA<sup>®</sup> LABORTECHNIK (Γερμανία)
- Αναδευτήρας περιδίνησης (vortex) model MS2 minishaker, IKA<sup>®</sup> works, Inc., (Η.Π.Α.)
- Ανακινούμενο και θερμοστατούμενο υδατόλουτρο UNITRONIC OR, J.P. SELECTA, s.a. (Ισπανία)
- Αναλυτικός ζυγός Kern 770, Kern & Sohn GmbH (Γερμανία)
- Διαθλασίμετρο PANalytical X'Pert Pro, Model PW3040/60 εξοπλισμένο με ανιχνευτή X'Celetor με πηγή ακτινοβολίας Cu K $\alpha$ , 40 kV και 45 Ma, PANalytical B.V. (Ολλανδία)
- Διπλότοιχος, ρινο-γαστρο-δωδεκαδακτυλικός σωλήνας Freka<sup>®</sup> Trelumina, CH/FR 16/9, 150 cm, Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Γερμανία), ο οποίος έχει εξωτερική διάμετρο 5,3 mm και στο τέλος του φέρει μια ελαστική προεξοχή. Μια σειρά από οπές 55-65 cm πάνω από ελαστική προεξοχή χρησιμοποιήθηκε για πρόσβαση στο άντρο του στομάχου. Επιπρόσθετα, ανοίχτηκε μια σειρά από οπές 13,5-23,5 cm πάνω από την ελαστική προεξοχή για την αναρρόφηση δειγμάτων από την περιοχή του συνδέσμου Treitz.
- Δοκιμασία ελέγχου εγκυμοσύνης Clearblue, Sarantis (Ελλάδα)
- Ελαστική μεμβράνη PARAFILM "M"<sup>®</sup>, PECHINEY PLASTIC PACKAGING (Η.Π.Α.)
- Εμπορικά διαθέσιμο κιτίο (kit) για μέτρηση ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου BCA<sup>™</sup> Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC (Η.Π.Α.)
- Θερμαινόμενη και ψυχόμενη φυγόκεντρος Universal 32 R, Hettich Zentrifugen (Γερμανία)
- Θερμαινόμενη και ψυχόμενη φυγόκεντρος Universal 320 R, Hettich Zentrifugen (Γερμανία)

- Ηθμοί διήθησης αναγεννημένης κυτταρίνης (RC) Titan 2 HPLC FILTER LT BROWN, 17 mm, 0.45 μm, SUN SRi (Η.Π.Α.)
- Ηθμοί διήθησης νιτρικής κυτταρίνης (0.45 μm) Purabind<sup>®</sup> 045, Whatman (Γερμανία)
- Ηθμοί διήθησης πολυβινυλδενοφθοριδίου (PVDF) [0.45 μm HV] Durapore<sup>®</sup> membrane filters, Millipore (Ιρλανδία)
- Ηθμοί διήθησης πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE) [0.45 μm] REZIST 30 / 0,45 PTFE, Whatman<sup>®</sup> (Γερμανία)
- Κυψελίδες χαλαζία, 104-QS, οπτική διαδρομή 10 mm, HELLEMA<sup>®</sup> (Γερμανία)
- Περιέκτες υάλινοι 4,5 mL (45×14,75 mm), CleanPack<sup>®</sup> Laboratory Chemical Packing (Η.Π.Α.)
- Περιέκτες πλαστικοί Micro tube 1.5 mL, Sarstedt (Γερμανία)
- Περιέκτες πλαστικοί Micro tube 2 mL, Sarstedt (Γερμανία)
- Περιέκτες πλαστικοί Tube with cap 5 mL, 57×15,3 mm, Sarstedt (Γερμανία)
- Περιέκτες πλαστικοί Tube with cap 10 mL, 79×16 mm, Sarstedt (Γερμανία)
- Πεχάμετρο Schott, model CG842, SCHOTT GLAS (Γερμανία)
- Πολυδιαυλική, περισταλτική αντλία IPC-12, ISM762, Ismatec S.A. (Ελβετία) με σωληνάκια PVC Manifold Tubing εσωτερικής διαμέτρου 0,63 mm, 1,29 mm και 1,52 mm, Watson-Marlow (Αγγλία)
- Προστήλη BDS C18 (10×4,6 mm, 5 μm) Hypersil<sup>®</sup>, ThermoQuest Inc. (Η.Π.Α.)
- Στήλη BDS C18 (250×4,6 mm, 5 μm) Hypersil<sup>®</sup>, ThermoQuest Inc. (Η.Π.Α.)
- Σύριγγες πλαστικές 20 mL, Codan Medical ApS (Η.Π.Α.)
- Σύριγγες πλαστικές 50(60 mL) CATETERE EXELMED, Montegrotto Terme PD (Ιταλία)
- Σύριγγες υάλινες 5 mL Glass Van<sup>®</sup>, Myco Medical Supplies Inc. (Η.Π.Α.)
- Σύριγγες υάλινες 10 mL Glass Van<sup>®</sup>, Myco Medical Supplies Inc. (Η.Π.Α.)
- Σύριγγες υάλινες 20 mL Glass Van<sup>®</sup>, Myco Medical Supplies Inc. (Η.Π.Α.)
- Συσκευή εξάτμισης (διαλυτών) υπό κενό, αποτελούμενο από αντλία κενού Buchi Rotavapor<sup>®</sup> R-200, και θερμοστατούμενο υδατόλουτρο Buchi Heating Bath R-490, Buchi Labortechnik (Ελβετία)

- 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.)
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία Spectra System P4000, αυτόματο δειγματολήπτη AS3000, ανιχνευτή UV/vis Spectra system UV1000 [ThermoQuest Inc. (Η.Π.Α.)] ή ανιχνευτή φορτισμένου αερολύματος ESA Corona<sup>®</sup>, ESA (Η.Π.Α.), και λογισμικό EZChrom Agilent<sup>®</sup> version 3,2 [Agilent Technologies Inc. (Η.Π.Α.)]
- Φασματοφωτόμετρο UV/vis UV-1700 PharmaSpec με λογισμικό UV-probe Shimadzu (Ιαπωνία)

## B.2 Δραστικές ουσίες

- Διπυριδαμόλη (DPD), [2-(6-[δισ (2-υδροξυαιθυλ)αμινο]-4,8-δισ(πιπεριδιν-1-υλ)-[1,3]διαζινο[5,4-d]πυριμιδιν-2-υλ}(2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθαν-1-όλη, lot # 08342, Boehringer Ingelheim Espanã, S.A. (Ισπανία)
- Κετοκοναζόλη (KCZ), [1-[4-(4-[(2S,4R)-2-(2,4-διχλωροφαινυλ)-2-(1H-ιμιδαζολ-1-υλμεθυλ)-1,3-διοξολαν-4-υλ]μεθοξυ}φαινυλ)πιπεραζιν-1-υλ]αιθαν-1-όνη, lot # 0712003723, Janssen Cork, Janssen Pharmaceutical Ltd. (Δημοκρατία της Ιρλανδίας)
- AZD0865 (AZD), 8-[(2,6-διμεθυλβενζυλ)αμινο]-N-(2-υδροξυαιθυλ)-2,3-διμεθυλμιδαζο [1,2-α] πυριδιν-6-καρβοξαμίδιο, AstraZeneca (Ηνωμένο Βασίλειο)
- SB705498 (SB), 1-(2-βρωμο-φαινυλ)-3-[(R)-1-(5-τριφθορομεθυλ-πυριδιν-2-υλ) πυρρολιδιν-3-υλ]ουρία, lot # R9532/1/1, GlaxoSmithKline (Ηνωμένο Βασίλειο)

## B.3 Αντιδραστήρια

- Αιθανόλη (99,5 % v/v), Panreac Co. (Ισπανία)



- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Γερμανία)
- Γλυκοδεοξυχολικό νάτριο, κατ' ελάχιστο 97 %, lot # 066K1791, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Γλυκοχηνοδεοξυχολικό νάτριο,  $\geq 97$  %, lot # 435441/1, Fluka BioChemika (Γερμανία)
- Γλυκοχολικό οξύ ένυδρο, κατ' ελάχιστο 97 %, lot # 124K5327, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Διαιθυλαμίνη, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën® (Γερμανία)
- Διπαλμιτική γλυκερόλη (Dipalmitin), περίπου 99 %, lot # 105K5200, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Διχλωρομεθάνιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Γερμανία)
- Ελαϊκό νάτριο σκόνη, καθαρότητας (88,9 % w/w), lot # 81070, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Ελαϊκό οξύ, Reagent Grade,  $\sim 99$  %, lot # 045K1732, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Ελαϊκός εστέρας χοληστερόλης,  $\geq 99,0$  %, lot# 1187029, Fluka BioChemika (Γερμανία)
- Λινελαϊκό οξύ, κατ' ελάχιστο 99 %, lot # 065K1744, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Μεθανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Γερμανία)
- Μηλεϊνικό οξύ, ReagentPlus®  $\geq 99$  % καθαρότητας, lot # 079K5415, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Μυρμηκικό αμμώνιο,  $\geq 97,0$  % καθαρότητας, lot # 1334494, Fluka (Γερμανία)
- Μυρμηκικό οξύ, 98-100 %, lot # SZE92090, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Νατραζίδιο, 99,99+ % metals basis, lot # 07901KH, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Νατριούχος Χλωραμφαινικόλη CHLORANIC® DR.PD.INJ. I.M or I.V., lot # 301016, NOPMA ΕΛΛΑΣ Α.Ε. (Ελλάδα)
- Νερό ΑΥΡΑ®, εμπορικά διαθέσιμο μη ανθρακούχο εμφιαλωμένο νερό (Ελλάδα)
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro ps. System (Η.Π.Α.)
- Ουρσοδεοξυχολικό οξύ, κατ' ελάχιστο 97 %, lot # 076K0097 Sigma-Aldrich (Γερμανία)
- Παλμιτικό οξύ, κατ' ελάχιστο 99 %, lot # 087K1877, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)

- Πολυαιθυλενογλυκόλη 400, SABOPEG 400, lot # 2-55247, CELLCO chemical Ltd. (Ελλάδα)
- Στεατικό οξύ,  $\geq 99,5$  %, lot# 1363187, Fluka (Γερμανία)
- Ταυροχηνοδεοξυχολικό νάτριο, καθαρότητας (96 %), lot # 065K5001, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Ταυροχολικό νάτριο, καθαρότητας ( $>99$  %), lot # 2007100274 Prodotti Chimici e Alimentari S.p.A. (Ιταλία)
- Τριαιθυλαμίνη, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Τριελαϊκή γλυκερόλη, Sigma Grade  $>99$  %, lot # 075K1772 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Γερμανία)
- Τριφθοροοξικό οξύ, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Panreac Co. (Ισπανία)
- Υδροξείδιο του νατρίου (σφαιρίδια), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, AppliChem GmbH (Γερμανία)
- Υδροξυ-προπυλο-μεθυλο-κυτταρίνη (HPMC) Pharmacoat 603, lot # 0118458, ShinEtsu (Ιαπωνία)
- Υδροξυ-προπυλο-μεθυλο-κυτταρίνη (HPMC) Pharmacoat 606, lot # 9038173, ShinEtsu (Ιαπωνία)
- Υδροχλωρικό οξύ, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Panreac Co. (Ισπανία)
- Φωσφατιδυλοχολίνη αυγού, Lipoid E PC<sup>®</sup> 99,1% καθαρότητας, lot # 105019-1/14, Lipoid GmbH (Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën<sup>®</sup> (Γερμανία)
- Χοληστερόλη Sigma grade, κατ' ελάχιστο 99 %, lot # 027K5303, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- Χολικό οξύ,  $\geq 99,0$  %, lot # 1152144, Fluka BioChemika (Γερμανία)
- 1-Μονοελαϊκή γλυκερόλη, 99 %, lot # 7523F, MP Biomedicals Inc. (Γαλλία)
- 2-προπανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC κατάλληλη για χρήση με ανιχνευτή Corona<sup>®</sup>, E. Merck (Γερμανία)
- 3-sn-Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη από κρόκο αυγού,  $\geq 99$  %, lot #1238724, Fluka BioChemika (Γερμανία)

#### B.4 Μέθοδοι προσδιορισμού

Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών, των χολικών αλάτων, των λιπιδίων και του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου των δειγμάτων περιγράφονται αναλυτικά στο Παράρτημα 1.

#### B.5 Κλινική μελέτη

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Νοσοκομείο «Κοργιαλένιο-Μπενάκειο-Ε.Ε.Σ.» μετά από αδειοδότηση από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (Ε.Ο.Φ., GR 210181 - EudraCT # 2008-006178-13) και την Εθνική Επιτροπή Δεοντολογίας (Ε.Ε.Δ., IS-111) και είχε διάρκεια περίπου 1 έτος (Φθινόπωρο 2008-Φθινόπωρο 2009) [Παράρτημα 2]. Ήταν μια μελέτη 4 φάσεων, διασταυρωτού σχεδιασμού. Σε κάθε φάση χορηγήθηκαν 240 mL διαλύματος δραστικής ουσίας στο άντρο του στομάχου νηστικών υγιών ενηλίκων εθελοντών ως εξής:

Φάση 1: Διάλυμα μικρής δόσης DPD (30 mg) [DPD-L]

Φάση 2: Διάλυμα μεγάλης δόσης DPD (90 mg) [DPD-H]

Φάση 3: Διάλυμα μικρής δόσης KCZ (100 mg) [KCZ-L]

Φάση 4: Διάλυμα μεγάλης δόσης KCZ (300 mg) [KCZ-H]

Για κάθε δραστική ουσία, και οι δύο δόσεις ήταν μέσα στο εύρος των φαρμακολογικά σχετικών εφάπαξ δόσεων (Εθνικό Συνταγολόγιο, 2007).

Τα δείγματα αναρροφήθηκαν από μια περιοχή κοντά στο σύνδεσμο Treitz σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και μέχρι 70 min μετά τη χορήγηση κάθε διαλύματος.

### *B.5.1 Παρασκευή χορηγηθέντων διαλυμάτων*

#### *Διαλύματα DPD*

Εμφιαλωμένο νερό ΑΥΡΑ® οξινίστηκε με πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, ώστε το pH να γίνει 2,7 (διάλυμα Α). Το διάλυμα DPD-L παρασκευάστηκε με διάλυση 30 mg DPD σε 240 mL διαλύματος Α (0,12 mg/mL). Το διάλυμα DPD-H παρασκευάστηκε με διάλυση 90 mg DPD σε 240 mL διαλύματος Α (0,38 mg/mL). Η τελική τιμή pH και των δύο διαλυμάτων ήταν 2,7.

#### *Διαλύματα KCZ*

Εμφιαλωμένο νερό ΑΥΡΑ® οξινίστηκε με πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, ώστε το pH του να γίνει 2,6 (διάλυμα Β) ή 2,4 (διάλυμα Γ). Το διάλυμα KCZ-L παρασκευάστηκε με διάλυση 100 mg KCZ σε 240 mL διαλύματος Β (0,42 mg/mL). Το διάλυμα KCZ-H παρασκευάστηκε με διάλυση 300 mg KCZ σε 240 mL διαλύματος Γ (1,25 mg/mL). Η τελική τιμή pH και των δύο διαλυμάτων ήταν 2,7.

Η σταθερότητα των διαλυμάτων DPD και KCZ ελέγχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 24 h.

### *B.5.2 Εθελοντές*

Οι υποψήφιοι εθελοντές υποβλήθηκαν σε συνέντευξη (Παράρτημα 3). Οι εθελοντές έπρεπε να μην έχουν ιστορικό ή κλινική εικόνα παθήσεων του ΓΕ συστήματος, να μη συμμετέχουν παράλληλα σε άλλη κλινική μελέτη, και να μην λαμβάνουν φάρμακα, τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία του ΓΕ συστήματος, τουλάχιστον μέχρι και 30 ημέρες πριν από τη συμμετοχή τους στη μελέτη. Η κατάσταση της υγείας τους επιβεβαιώθηκε τόσο με φυσική εξέταση, όσο και με εξετάσεις αίματος, με τις οποίες εξετάστηκαν παράμετροι, οι οποίοι είχαν σχέση με τη λειτουργία των νεφρών, του ήπατος και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Στη μελέτη συμμετείχαν 12 υγιείς ενήλικες (10 άντρες και 2 γυναίκες) με μέση τιμή ηλικίας 26 χρονών (εύρος 20-38 χρονών) μετά από γραπτή συγκατάθεση (Παράρτημα 3). Ένας εθελοντής ήταν 15 % βαρύτερος, ενώ οι υπόλοιποι ήταν μέχρι 20 % πιο αδύνατοι από το ιδανικό σωματικό βάρος τους.

Οι δύο εθελόντριες δεν ήταν έγκυες σύμφωνα με γραπτή δήλωσή τους και με βάση το αποτέλεσμα της δοκιμασίας εγκυμοσύνης το πρωί κάθε πειραματικής ημέρας. Μια από τις εθελόντριες λάμβανε αντισυλληπτικά φάρμακα για περισσότερο από 3 μήνες πριν από τη συμμετοχή της στη μελέτη και πήρε την αντισύλληψη, που αντιστοιχούσε στην πειραματική ημέρα, μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής ημέρας.

### *B.5.3 Πρωτόκολλο*

Για κάθε εθελοντή, η μελέτη έλαβε χώρα δύο χωριστές πειραματικές ημέρες. 3 ημέρες πριν από και κατά τη διάρκεια κάθε πειραματικής ημέρας απαγορευόταν η λήψη αλκοόλ και κάθε μη συνταγογραφούμενου ιδιοσκευάσματος, ενώ η λήψη τροφής διακόπηκε 12 h πριν από την έναρξη κάθε πειραματικής ημέρας. Ο εθελοντής μπορούσε να καταναλώνει νερό *ad libitum*. Περίπου στις 8 π.μ. κάθε πειραματικής ημέρας ο εθελοντής/τρια ερχόταν στο νοσοκομείο, εξεταζόταν για την εξακρίβωση της κατάστασης της υγείας του/της από το γαστρεντερολόγο και υποβαλόταν σε σχετική συνέντευξη (Παράρτημα 3).

#### *Πειραματική ημέρα Α*

Μετά από ψεκασμό της βάσης του στόματος με λιδοκαΐνη, ένας άσηπτος διπλότοιχος ρινο-γαστρο-δωδεκαδακτυλικός σωλήνας τοποθετήθηκε στον εθελοντή. Δεν έγινε καμία προσπάθεια να απομονωθεί η περιοχή αναρρόφησης από τα υπόλοιπα περιεχόμενα του ΓΕ αυλού. Η εισαγωγή του σωλήνα έγινε από ακτινολόγο παρουσία του γαστρεντερολόγου, υποβοηθήθηκε από ένα συρμάτινο οδηγό και η διαδικασία έγινε υπό ακτινοσκόπηση. Μετά την τοποθέτηση του σωλήνα και την απομάκρυνση του οδηγού, ο εθελοντής τοποθετήθηκε σε ημι-ύπτια θέση και

χορηγήθηκαν 240 mL DPD-L με σύριγγες χωρητικότητας 60 mL στο άντρο του στομάχου. Η διάρκεια της χορήγησης ήταν περίπου 1 min και δείγματα (μέχρι περίπου 7 mL) αναρροφήθηκαν από την περιοχή του συνδέσμου Treitz 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 και 70 min μετά τη χορήγηση του διαλύματος. Αμέσως μετά από κάθε αναρρόφηση, 8 mL αέρα διοχετεύονταν μέσα στο σωλήνα, ώστε να επιστρέψουν πιθανά υπολείμματα της αναρρόφησης από το τοίχωμα του σωλήνα στον εντερικό αυλό (ο συνολικός εσωτερικός όγκος του σωλήνα δειγματοληψίας εκτιμήθηκε ότι ήταν περίπου 4 mL). Μετά την αναρρόφηση του τελευταίου δείγματος, χορηγήθηκαν 200 mL εμφιαλωμένο νερό ΑΥΡΑ® και ο εθελοντής αφέθηκε σε ημι-ύπτια θέση να χαλαρώσει για 2 h. Μετά το πέρας αυτού του δώρου, 240 mL DPD-H χορηγήθηκαν στον εθελοντή, και δείγματα αναρροφήθηκαν, όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω. Στο τέλος της πειραματικής ημέρας και πριν από την απομάκρυνση του σωλήνα, η θέση του επιβεβαιώθηκε ακτινοσκοπικά (Παράρτημα 4).

#### Πειραματική ημέρα Β

Σε σχέση με την πειραματική ημέρα Α, η μόνη διαφορά ήταν η ταυτότητα των χορηγηθέντων διαλυμάτων ΚCZ. Πρώτα χορηγήθηκε το ΚCZ-L και στη συνέχεια το ΚCZ-H.

Ο ολικός μέσος/διάμεσος όγκος αναρροφηθέντος δείγματος ήταν 5,5/6,4 mL όταν στους 12 εθελοντές χορηγήθηκαν τα διαλύματα DPD, και 6,3/7,0 mL όταν στους 12 εθελοντές χορηγήθηκαν τα διαλύματα ΚCZ. Αυτό πρακτικά συνεπάγεται ότι ο ολικός όγκος αναρροφηθέντος εντερικού υγρού από το τέλος του δωδεκαδάκτυλου κατά τη διάρκεια κάθε φάσης ήταν περίπου 40-45 mL.

Στο τέλος κάθε φάσης, ο μέσος όγκος υγρού στο στόμαχο ( $4,3 \pm 2,0$  mL) δεν ήταν υψηλότερος από αυτόν πριν από τη χορήγηση του διαλύματος της δραστικής ουσίας ( $10 \pm 15$  mL), ενώ η συγκέντρωση των χολικών αλάτων στο στόμαχο μετά το πέρας των αναρροφήσεων ήταν ελάχιστη (μέχρι 50  $\mu$ M). Από αυτά τα δεδομένα συνεπάγεται ότι η εισροή δωδεκαδακτυλικών περιεχομένων στο στόμαχο κατά τη διάρκεια ενός πειράματος, αν υπήρξε, ήταν ελάχιστη.

Οι διάμεσες τιμές του συνολικού αναρροφηθέντος όγκου/pH των περιεχομένων του στομάχου και του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου πριν από την πρώτη χορήγηση της DPD ήταν 6,2 mL/1,7 και 1,2 mL/6,6, αντίστοιχα, ενώ πριν από τη δεύτερη χορήγηση DPD ήταν 9,0 mL/2,6 και 2,0 mL/6,2, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες τιμές πριν από την πρώτη χορήγηση KCZ ήταν 3,3 mL/1,8 και 0,8 mL/7,0, αντίστοιχα, ενώ πριν από τη δεύτερη χορήγηση ήταν 10,0 mL/2,0 και 2,0 mL/5,5, αντίστοιχα. Η διάμεση τιμή της ποσότητας δραστικής ουσίας στο στόμαχο πριν από τη δεύτερη χορήγηση της DPD δεν μπορούσε να ποσοτικοποιηθεί, ενώ πριν από τη δεύτερη χορήγηση της KCZ ήταν λιγότερη από 33  $\mu\text{g}$ . Η διάμεση τιμή της συγκέντρωσης δραστικής ουσίας στο λεπτό έντερο πριν από τη δεύτερη χορήγηση της DPD ήταν 2,1  $\mu\text{g/mL}$ , ενώ πριν από τη δεύτερη χορήγηση της KCZ ήταν 4,9  $\mu\text{g/mL}$ . Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν, ότι η δίωρη περίοδος μεταξύ των δύο χορηγήσεων κάθε πειραματικής ημέρας ήταν επαρκής, ώστε το πρώτο διάλυμα, που χορηγήθηκε, να απομακρυνθεί πρακτικά από το ανώτερο τμήμα του ΓΕ σωλήνα, πριν από τη χορήγηση του δεύτερου διαλύματος.

#### *B.5.4 Χειρισμός των αναρροφηθέντων δειγμάτων*

Αμέσως μετά την αναρρόφηση, κάθε δείγμα χωρίστηκε σε δύο μέρη. Στο πρώτο προσδιορίστηκε η συνολική περιεκτικότητα σε δραστική ουσία (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη),  $C_t$ , εις διπλούν. Ένας περιέκτης γέμισε με το δεύτερο μέρος και σφραγίστηκε με ελαστική μεμβράνη, για να μειωθεί η απώλεια των διττανθρακικών κατά τον περαιτέρω χειρισμό του δείγματος (Παράρτημα 5). Ο περιέκτης τοποθετήθηκε αμέσως στη φυγόκεντρο και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (37 °C, 12560  $\times$  g, 10 min) [Παράρτημα 6]. Το υπερκείμενο χωρίστηκε σε τέσσερα μέρη. Στο πρώτο προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας,  $C_s$ , εις διπλούν. Το δεύτερο επώαστηκε (37 °C, 48 h, 75 oscillations/min) σε σφραγισμένο υάλινο περιέκτη, και αφού φυγοκεντρήθηκε (37 °C, 12560  $\times$  g, 10 min), προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας,  $C_{inc}$ . Το τρίτο επώαστηκε (37 °C, 48 h, 75 oscillations/min) σε σφραγισμένο υάλινο περιέκτη παρουσία περίσσειας σκόνης δραστικής ουσίας, και αφού φυγοκεντρήθηκε (37 °C, 12560  $\times$  g,

10 min), προσδιορίστηκε η διαλυτότητα κορεσμού,  $C_s$ . Ο χρόνος εξισορρόπησης σε ταυτόσημες πειραματικές συνθήκες έχει αναφερθεί, ότι είναι πολύ μικρότερος από 48 h για τη μέτρηση της διαλυτότητας κορεσμού της DPD και της KCZ σε ανθρώπινο εντερικό υγρό, το οποίο δεν περιείχε αρχικά δραστική ουσία (Kalantzi et al. 2006b). Παράλληλα, η εργαστηριακή εμπειρία με αυτές τις δραστικές ουσίες απέδειξε ότι είναι σταθερές σε δείγματα ενδοαυλικών περιεχομένων, τα οποία επώαστηκαν (Kalantzi et al. 2006b, Vertzoni et al. 2007, Vertzoni et al. 2010). Το τέταρτο μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των σημαντικότερων χολικών αλάτων στο ανθρώπινο εντερικό υγρό κατά τη διαπεπτική περίοδο [ταυροχολικό (TC), γλυκοχολικό (GC), ταυροχνοδεοξυχολικό (TCDC), ουρσοδεοξυχολικό (USD), γλυκοχνοδεοξυχολικό (GCDC), γλυκοδεοξυχολικό (GDC) και χολικό (C)], λεκιθίνης (φωσφατιδυλοχολίνης και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης), χοληστερόλης, ελεύθερων λιπαρών οξέων (λινελαϊκό, παλμιτικό και στεατικό οξύ), μονογλυκερίδιο (1-μονοελαϊκή γλυκερόλη) και, τέλος, για τον προσδιορισμό του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου. Πρέπει να σημειωθεί, ότι κάθε αναρροφηθέν δείγμα αναλύθηκε και ως προς την πιθανότητα να περιέχει διγλυκερίδιο (διπαλμιτική γλυκερόλη), τριγλυκερίδιο (τριελαϊκή γλυκερόλη) ή ελαϊκό εστέρα της χοληστερόλης (Παράρτημα 1).

Μετά από κάθε φυγοκέντρηση, όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο απομακρυνόταν από τον περιέκτη, έτσι ώστε μόνο το στερεό, το οποίο πιθανόν να είχε καθιζήσει, να παραμείνει στον περιέκτη. Μετά από όλες τις σχετικές αναλύσεις, υπολείμματα, που περιείχαν τουλάχιστον 0,1 mg στερεού δραστικής ουσίας υποβλήθηκαν σε ανάλυση περίθλασης ακτίνων-X (XRPD). Τα δείγματα σαρώθηκαν από γωνία  $2,0^\circ$  μέχρι  $40,0^\circ$  ( $2\theta$ ) με χρήση βήματος  $0,0167^\circ$   $2\theta$  και 31,75 s χρόνο μέτρησης. Μερικά mg δείγματος τοποθετήθηκαν σε πλάκες Si wafer (μηδενικός θόρυβος), με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λεπτό στρώμα σκόνης. Για να επιβεβαιωθεί ότι οι κορυφές, οι οποίες παρατηρήθηκαν κατά τις μετρήσεις οφείλονταν στη δομή του στερεού της δραστικής ουσίας και όχι σε άλλα στερεά, τα οποία υπήρχαν στα εντερικά υγρά, τα δείγματα αναλύθηκαν σε τυχαία βάση με τεχνικές FT-IR και NMR.

Τα δείγματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των  $C_t$  και  $C$  φυλάχτηκαν στους  $-20^\circ\text{C}$ . Τα δείγματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των  $C_{inc}$  και



$C_s$ , επωάστηκαν αμέσως. Τα δείγματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό χολικών αλάτων, λεκιθίνης, χοληστερόλης, μονογλυκεριδίου και ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, φυλάχτηκαν στους  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  σε ξεχωριστούς περιέκτες, έτσι ώστε η ανάλυση να λάβει χώρα αμέσως μετά την πρώτη τήξη.

Η μέτρηση του  $C_t$  περιελάμβανε την προσθήκη ακετονιτριλίου σε αναλογία όγκων 1:6 (δείγμα:ακετονιτρίλιο), ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης διάλυση των σωματιδίων του φαρμάκου, τα οποία πιθανόν υπήρχαν στο αναρροφηθέν δείγμα. Μετά από ανάδευση και φυγοκέντρηση ( $10\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12560 \times g$ , 10 min), το υπερκείμενο αραιώθηκε με κινητή φάση πριν από την ένεση στο σύστημα HPLC (Παράρτημα 1). Η μέτρηση των  $C$ ,  $C_{inc}$  και  $C_s$  περιελάμβανε προσθήκη ακετονιτριλίου, ανάδευση, φυγοκέντρηση ( $10\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12560 \times g$ , 10 min) και κατάλληλη αραιώση του υπερκειμένου με κινητή φάση πριν από την ένεση στο σύστημα HPLC (Παράρτημα 1). Η μέτρηση της συγκέντρωσης χολικών αλάτων, λεκιθίνης, χοληστερόλης, ελεύθερων λιπαρών οξέων και μονογλυκεριδίου περιελάμβανε την κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη χρήση ακετονιτριλίου στην περίπτωση των χολικών αλάτων, και προανόλης στην περίπτωση των λιπών και της χοληστερόλης, ανάδευση, φυγοκέντρηση ( $10\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12560 \times g$ , 10 min) και κατάλληλη αραιώση του υπερκειμένου με κινητή φάση πριν από την ένεση στο σύστημα HPLC-ανιχνευτή φορτισμένου αερολύματος (Παράρτημα 1). Το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο των αναρροφηθέντων δειγμάτων προσδιορίστηκε με εμπορικά διαθέσιμο κιτίο [kit] (Παράρτημα 1).

#### *B.5.5 Ανάλυση των δεδομένων της κλινικής μελέτης*

Τα πρωτογενή δεδομένα της κλινικής μελέτης παρουσιάζονται ως θηκογράμματα. Σε κάθε θηκόγραμμα φαίνεται η διάμεση τιμή, το  $10^\circ$ ,  $25^\circ$ ,  $75^\circ$  και  $90^\circ$  εκατοστημόριο, το  $5^\circ$  και  $95^\circ$  εκατοστημόριο ως εξωκείμενες παρατηρήσεις, και με άσπρη, συνεχή γραμμή η μέση τιμή. Η ολική μοριακή συγκέντρωση των μικκυλιακών συστατικών υπολογίστηκε ως το άθροισμα των μοριακών συγκεντρώσεων των χολικών αλάτων, της λεκιθίνης (άθροισμα φωσφατιδυλοχολίνης και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης), των ελεύθερων λιπαρών οξέων, του μονογλυκεριδίου και της χοληστερόλης.

Τα κλάσματα καθίζησης και οι δείκτες υπερκορεσμού στα αναρροφηθέντα δείγματα,  $\pi_{lumen}$  και  $\sigma_{lumen}$ , υπολογίστηκαν με τη χρήση των εξισώσεων A.11 και A.7, αντίστοιχα. Τα κλάσματα καθίζησης μετά την επώαση (48h/37°C) των υπερκειμένων των μεμονωμένων αναρροφηθέντων δειγμάτων,  $\pi_{lumen}^{inc}$ , και οι δείκτες υπερκορεσμού στα αντίστοιχα δείγματα,  $\sigma_{lumen}^{inc}$ , υπολογίστηκαν με τη χρήση των εξισώσεων B.1 και B.2, αντίστοιχα:

$$\pi_{lumen}^{inc} = I - \frac{C_{inc}}{C} \quad (B.1)$$

$$\sigma_{lumen}^{inc} = \frac{C}{C_S} - I \quad (B.2)$$

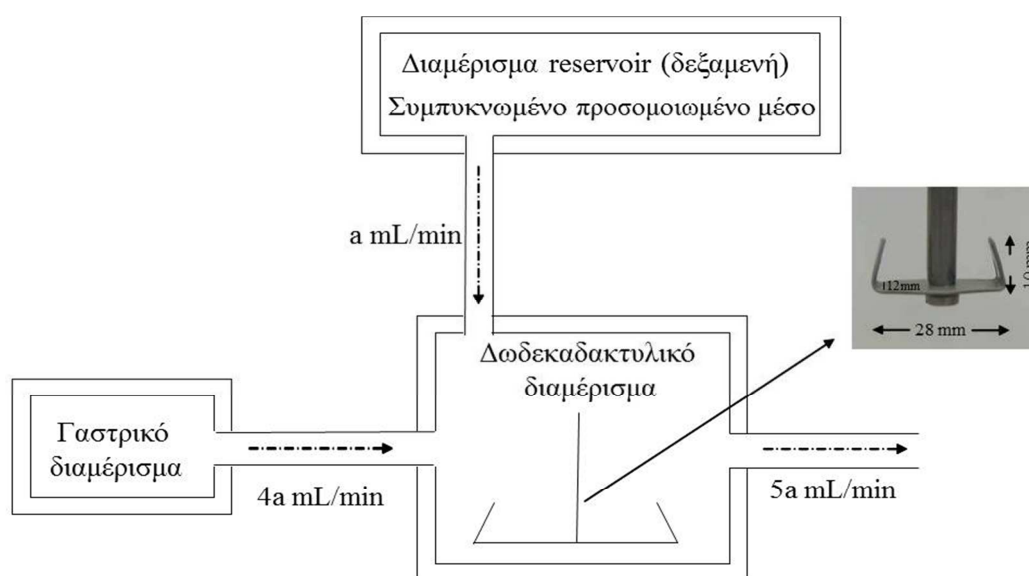
Η σημαντικότητα των κλασμάτων καθίζησης ( $\pi > 0$ ) ελέγχθηκε με μονόπλευρη δοκιμασία t ενός δείγματος ή με μονόπλευρη δοκιμασία Wilcoxon ενός δείγματος, ανάλογα με την κατανομή των δεδομένων στον πληθυσμό. Η στατιστικά σημαντική διαφορά των δεικτών υπερκορεσμού από το μηδέν ελέγχθηκε με αμφίπλευρη δοκιμασία t ενός δείγματος ή με αμφίπλευρη δοκιμασία Wilcoxon ενός δείγματος, ανάλογα με την κατανομή των δεδομένων στον πληθυσμό. Το σφάλμα τύπου I ορίστηκε 0,05. Ο έλεγχος της κατανομής των δεδομένων στον πληθυσμό έγινε με τη χρήση λογισμικού SigmaStat 3,5, SPSS Science Inc. (Η.Π.Α.). Οι δοκιμασίες t και Wilcoxon πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση λογισμικού S-Plus 4,5, Insightful Corporation (Η.Π.Α.).

## B.6 *In vitro* πειράματα

### B.6.1 *In vitro* διάταξη

Η διάταξη παρουσιάζεται στα Σχήματα B.1 (σηματική απεικόνιση) και B.2 (φωτογραφία). Όλα τα διαμερίσματα ήταν διπλότοιχα και το σύστημα διατηρούταν σε θερμοκρασία  $37 \pm 0,5$  °C. Το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ήταν κυλινδρικό διπλότοιχο ποτήρι συνολικού όγκου 150 mL και εσωτερικής διαμέτρου 5,5 cm. Οι

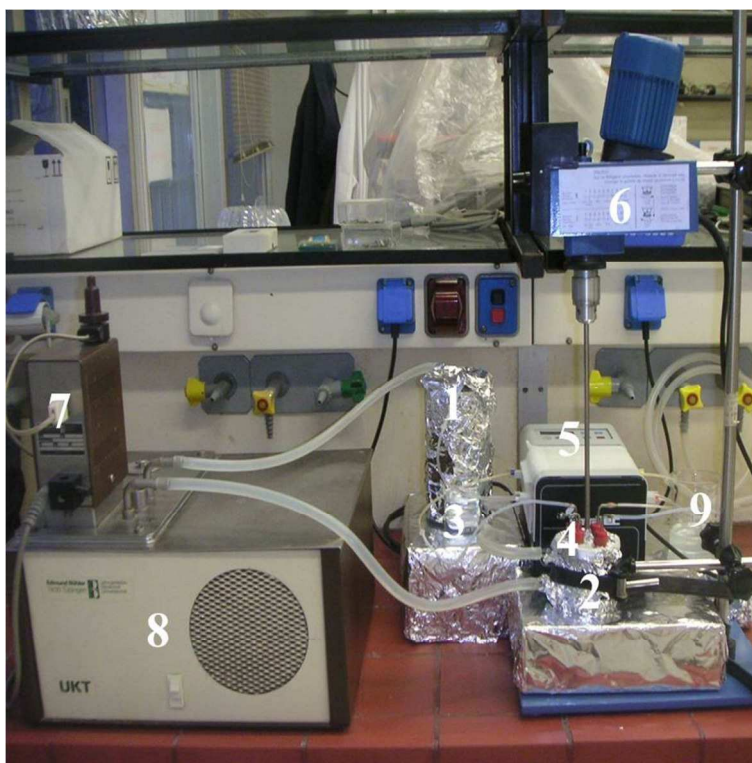
ροές ελέγχονταν από μια πολυδιαυλική περισταλτική αντλία, η οποία έδινε τη δυνατότητα διαφορετικών ρυθμών ροής. Το άθροισμα των εισερχόμενων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ρυθμών ροής ήταν ίσο με τον εξερχόμενο από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ρυθμό ροής (Σχήμα B.1). Αποτέλεσμα αυτού του συνδυασμού ροών ήταν το γεγονός, ότι ο όγκος των περιεχομένων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα παρέμενε σταθερός στα 60 mL καθόλη τη διάρκεια ενός πειράματος.



**Σχήμα B.1:** Σχηματική απεικόνιση της τρι-διαμερισματικής διάταξης, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων και της καθίζησης των υψηλής διαπερατότητας, λιπόφιλων ασθενών βάσεων στο λεπτό έντερο υγιών εθελοντών κατά τη διαπετική περίοδο, και φωτογραφία του πτερυγίου, που χρησιμοποιήθηκε για την ανάμιξη των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος.

Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος, τα περιεχόμενα του γαστρικού διαμερίσματος και του διαμερίσματος reservoir (δεξαμενή) αναμιγνύονταν ελαφρώς με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Τα περιεχόμενα του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος αναμιγνύονταν με τη χρήση ενός πτερυγίου με σχήμα U (Σχήμα B.1). Το πτερύγιο περιστρεφόταν με 200 rpm. Το πτερύγιο ήταν τοποθετημένο στο κέντρο και όσο το δυνατόν πιο κοντά στον πυθμένα του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος. Αυτές οι συνθήκες διασφάλιζαν τέλειες συνθήκες ανάμιξης με ελάχιστη ανατάραξη, και,

ουσιαστική και αντιπροσωπευτική δειγματοληψία του στερεού υλικού, που πιθανόν να καθίζανε.



**Σχήμα Β.2:** Φωτογραφία της τρι-διαμερισματικής διάταξης, που απεικονίζεται σχηματικά στο Σχήμα Β.1. 1: Γαστρικό διαμέρισμα, 2: Δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, 3: Διαμέρισμα reservoir (δεξαμενή), 4: Δειγματολήπτης, 5: Πολυδιαυλική περισταλτική αντλία, 6: Αναδευτήρας κεφαλής, 7: Κυκλοφορητής, 8: Υδατόλουτρο και 9: Ποτήρι ζέσεως όπου καταλήγει το υγρό που εξέρχεται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

Στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε διάλυμα ή εναιώρημα, ανάλογα με το πώς έχουν συλλεχθεί τα *in vivo* δεδομένα (Κεφ. Β.6.2).

Το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα περιείχε ένα μέσο, το οποίο προσομοιώνει τη σύσταση των περιεχομένων του ανθρώπινου λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο (FaSSIF-V2plus). Συγκρινόμενο με το FaSSIF-V2 (Jantratid et al. 2008), το FaSSIF-V2plus περιέχει, επίσης, ελεύθερα λιπαρά οξέα (ελαϊκό νάτριο) και χοληστερόλη (Πίνακας Β.1). Οι συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών

αντικατοπτρίζουν τις μέσες τιμές τους στο ανώτερο τμήμα του ανθρώπινου λεπτού εντέρου, όπως αυτές προσδιορίστηκαν στην παρούσα κλινική μελέτη.

**Πίνακας Β.1:** Σύσταση του FaSSIF-V2 (Jantratid et al. 2008) vs. FaSSIF-V2plus.

	<b>FaSSIF-V2</b>	<b>FaSSIF-V2plus</b>
<b>pH</b>	6,5	6,5
<b>Μηλεϊνικό οξύ (mM)</b>	19,12	19,12
<b>Υδροξείδιο του Νατρίου (mM)</b>	34,8	34,8
<b>Χλωριούχο Νάτριο (mM)</b>	68,62	68,62
<b>Ταυροχολικό Νάτριο (mM)</b>	3	3
<b>Φωσφατιδυλοχολίνη αυγού (mM)</b>	0,2	0,2
<b>Χοληστερόλη (mM)</b>	-	0,2
<b>Ελαϊκό Νάτριο (mM)</b>	-	0,5

Για την παρασκευή του FaSSIF-V2plus, 0,1712 g ελαϊκού νατρίου διαλύονται σε 1 L FaSSIF-V2. Στη συνέχεια, 0,0781 g χοληστερόλης, διαλυμένα σε ~10 mL διχλωρομεθανίου, προστίθενται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός γαλακτώματος. Ακολουθεί εξάτμιση του διχλωρομεθανίου στους 40 °C περίπου με μαγνητική ανάδευση. Το τελικό διάλυμα μικκυλίων είναι ελαφρώς ομιχλώδες (hazy) χωρίς οσμή διχλωρομεθανίου. Τέλος, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο όγκος προσαρμόζεται σε 1 L με απιονισμένο νερό. Η ανωτερότητα του FaSSIF-V2plus σε σχέση με το FaSSIF-V2 στην πρόβλεψη των ενδοαυλικών συγκεντρώσεων επιβεβαιώθηκε με τη χρήση KCZ-H στο γαστρικό διαμέρισμα.

Το διαμέρισμα reservoir (δεξαμενή) περιείχε συμπυκνωμένο FaSSIF-V2plus, το οποίο εισερχόμενο στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα εξισορροπούσε την αραίωση και τη μεταβολή του pH των περιεχομένων του λόγω της εισροής του όξινου

διαλύματος των δραστικών ουσιών από το γαστρικό διαμέρισμα. Χρησιμοποιώντας 50 mL FaSSIF-V2plus στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα βρέθηκε ότι το συμπυκνωμένο FaSSIF-V2plus στο διαμέρισμα reservoir (δεξαμενή) έπρεπε να έχει 6 φορές μεγαλύτερη ρυθμιστική χωρητικότητα από το FaSSIF-V2plus, ώστε το pH στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα να παραμένει σταθερό (περίπου 6,5) καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπρόσθετα, επειδή ο εισερχόμενος από το γαστρικό διαμέρισμα όγκος στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ήταν 4 φορές μεγαλύτερος από αυτόν, ο οποίος εισερχόταν από το διαμέρισμα δεξαμενή (Σχήμα B.1), η συγκέντρωση όλων των άλλων συστατικών του συμπυκνωμένου FaSSIF-V2plus ήταν 4 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση του FaSSIF-V2plus.

#### *B.6.2 Σύσταση γαστρικού διαμερίσματος*

##### *Πειράματα με διαλύματα DPD και KCZ*

Για την προσομοίωση των συνθηκών χορήγησης της κλινικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα δύο υδροχλωρικά διαλύματα της DPD και τα δύο υδροχλωρικά διαλύματα της KCZ, τα οποία μελετήθηκαν στην κλινική μελέτη και η μέθοδος παρασκευής τους περιγράφεται στο Κεφάλαιο B.5.1. Πριν από την έναρξη κάθε πειράματος τα 240 mL κάθε διαλύματος αναμιγνύονταν με 10 mL υδροχλωρικού διαλύματος, pH 1,8, ώστε να ληφθεί υπόψη ο υπολειπόμενος όγκος στο στόμαχο κατά τη διαπεπτική περίοδο. Για αυτόν το λόγο, το pH των περιεχομένων στο γαστρικό διαμέρισμα ήταν 2,4-2,6.

##### *Πειράματα με διαλύματα AZD*

Παρασκευάστηκαν δύο Φ/Μ (διαλύματα), όπως αυτές είχαν χορηγηθεί προηγουμένως σε υγιείς εθελοντές σε μια σειρά κλινικών μελετών (Carlert et al. 2010). Από τα διαλύματα που αναφέρονται στη συγκεκριμένη δημοσίευση επιλέχθηκαν εκείνα, τα οποία αντιστοιχούσαν στη μέγιστη χορηγηθείσα δόση κάθε μελέτης. Επειδή οι δόσεις στις συγκεκριμένες κλινικές μελέτες αναφέρονται ως

mg/kg, για την παρασκευή και δοκιμή των Φ/Μ *in vitro*, το βάρος ενός ενήλικα θεωρήθηκε 75 Kg.

Για την παρασκευή του AZD Διαλύματος 1 (AZD-1), 310 mg AZD διαλύθηκαν σε 110 mL ενός υδατικού διαλύματος, που περιείχε 22 mL PEG-400 (20 % v/v), 5,5 mL EtOH 99,5 % (5 % v/v) και την απαραίτητη ποσότητα HCl, ώστε το τελικό φαινόμενο pH να είναι 3 (Carlert et al. 2010). Το AZD-1 είχε συγχορηγηθεί με 240 mL νερού *in vivo* και λαμβάνοντας υπόψη τα υπολειπόμενα γαστρικά περιεχόμενα κατά τη διαπεπτική περίοδο, το AZD-1 αραιώθηκε με 250 mL HCl διαλύματος pH 3. Για την παρασκευή του AZD Διαλύματος 2 (AZD-2), 65 mg AZD διαλύθηκαν σε 21,3 mL ενός υδατικού διαλύματος, που περιείχε 4,26 mL PEG400 (20 % v/v), 1,065 mL EtOH 99,5 % (5 % v/v) και την απαραίτητη ποσότητα HCl ώστε το τελικό φαινόμενο pH να είναι 3 (Carlert et al. 2010). Το AZD-2 είχε συγχορηγηθεί με 100 mL νερού *in vivo* και λαμβάνοντας υπόψη τα υπολειπόμενα γαστρικά περιεχόμενα κατά τη διαπεπτική περίοδο, το AZD-2 αραιώθηκε με 110 mL HCl διαλύματος pH 3.

#### Πειράματα με εναιωρήματα και διαλύματα SB

Μελετήθηκαν τρία εναιωρήματα, τα οποία προσομοίωναν τις ενδογαστρικές συνθήκες μετά τη χορήγηση δισκίων άμεσης αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας SB. Τα SB Εναιώρημα 1, SB Εναιώρημα 2 και SB Εναιώρημα 3 προσομοίωναν τις ενδογαστρικές συνθήκες αμέσως μετά τη χορήγηση 2 SB δισκίων (5 mg/δισκίο), 4 SB δισκίων (25 mg/δισκίο), and 16 SB δισκίων (25 mg/δισκίο), αντίστοιχα. Αυτές οι δόσεις είχαν χορηγηθεί μαζί με ένα ποτήρι νερό σε υγιείς ενήλικες σε προηγούμενη κλινική μελέτη (αρχείο προμηθευτή). Τα εναιωρήματα χρησιμοποιήθηκαν για να προσομοιώσουν τις πιθανές συνθήκες στο στόμαχο μετά την αποσάθρωση των δισκίων. Από τη μια πλευρά, το δισκίο διασπείρεται σε στερεά σωματίδια, από τα οποία η δραστική ουσία πρέπει να διαλυθεί, και από την άλλη, ιδίως στις περιπτώσεις των δύο υψηλότερων δόσεων της δραστικής ουσίας SB, καθώς η διάλυση της δραστικής ουσίας από τα διασπαρμένα στερεά σωματίδια λαμβάνει χώρα, η διαλυτότητα επιτυγχάνεται πολύ γρήγορα. Επισημαίνεται ότι οι λόγοι Δόση/Διαλυτότητα της δραστικής ουσίας SB σε όξινα διαλύματα με τιμές pH παρόμοιες με αυτές του στομάχου κατά τη διαπεπτική περίοδο (pH 2) είναι 165 mL,

1653 mL, and 6611 mL για τις δόσεις 10 mg, 100 mg και 400 mg, αντίστοιχα (αρχείο προμηθευτή).

Επειδή κάθε δισκίο, που χορηγήθηκε σε ανθρώπους, περιείχε 12,5 mg HPMC 603, 5,5 mg HPMC 606 και 0,61 mg PEG-400, κατάλληλες ποσότητες αυτών των εκδόχων συμπεριλήφθηκαν κατά την παρασκευή κάθε εναιωρήματος. Θεωρώντας ότι κάθε δόση χορηγήθηκε με 240 mL νερό, ένα λίτρο SB Εναιωρήματος 1 παρασκευάστηκε με διάλυση 104,2 mg Pharmacoat 603, 45,8 mg Pharmacoat 606 και 5,1 mg PEG400 σε ένα λίτρο υδροχλωρικού διαλύματος, pH 2,5, και με απαιώρηση 41,6 mg της δραστικής SB στο διάλυμα. Για την παρασκευή ενός λίτρου SB Εναιωρήματος 2, 208,4 mg Pharmacoat 603, 91,6 mg Pharmacoat 606 και 10,2 mg PEG400 διαλύθηκαν σε ένα λίτρο υδροχλωρικού διαλύματος, pH 2,5, και 416,6 mg της δραστικής ουσίας SB απαιώρηθηκαν στο διάλυμα. Για την παρασκευή ενός λίτρου SB Εναιωρήματος 3, 0,8334 g Pharmacoat 603, 0,3666 g Pharmacoat 606 and 40,6 mg PEG400 διαλύθηκαν σε ένα λίτρο υδροχλωρικού διαλύματος, pH 2,5, και 1,6667 g της δραστικής SB απαιώρηθηκαν στο διάλυμα.

Για να καταστεί δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων και να ποσοτικοποιηθεί η καθίζηση (αν υπάρχει) στο *in vitro* πείραμα, απαιτείται επαναλήψιμη κένωση των σωματιδίων, δηλ. το εναιώρημα δε θα πρέπει να αποτελείται από συσσωματώματα σωματιδίων. Για αυτό, παρά το γεγονός, ότι η συσχέτιση μεταξύ των *in vivo* και *in vitro* δεδομένων θα επηρεαζόταν στην περίπτωση του σχηματισμού *in vivo* συσσωματωμάτων σωματιδίων, κάθε εναιώρημα, μετά την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας SB, και μετά από 5 κύκλους στους υπέρηχους στους 37 °C (20 min/κύκλο) και ανάδευση με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα (30 min/κύκλο) στους 37 °C, τοποθετήθηκε σε συσκευή διάλυσης περιστρεφόμενου πτερυγίου, όπου αναδεύτηκε για 48 h στους 37 °C. Το πτερύγιο περιστρεφόταν με 150 rpm. Την ημέρα του πειράματος, το εναιώρημα τοποθετήθηκε στους υπέρηχους για 20 min στους 37 °C και στη συνέχεια αναδεύτηκε με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα στους περίπου 37 °C για 1 h.

Τα κορεσμένα εναιωρήματα επέτρεψαν τη μελέτη της επίδρασης των στερεών σωματιδίων αποκλειστικά στην καθίζηση, δεδομένης της μη ταυτόχρονης δυνατότητας για διάλυση σωματιδίων. Περίπου μισή ποσότητα από κάθε εναιώρημα διηθήθηκε μέσω ηθμών PTFE με τη χρήση υάλινων συριγγών. Ανάλογα με το



εναιώρημα, που διηθήθηκε, τα διηθήματα χαρακτηρίστηκαν ως SB Διάλυμα 1, SB Διάλυμα 2, και SB Διάλυμα 3. Για κάθε δόση, πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν ξεχωριστά πειράματα για το εναιώρημα και το αντίστοιχο διάλυμα (χωρίς την παρουσία σωματιδίων).

### *B.6.3 Μεθοδολογία πραγματοποίησης των in vitro πειραμάτων και ανάλυσης των δεδομένων*

Μετά από διάφορα προκαταρκτικά πειράματα (Παράρτημα 7) τα *in vitro* πειράματα πραγματοποιήθηκαν ως εξής: Η κινητική της διαδικασίας κένωσης από το γαστρικό διαμέρισμα θεωρήθηκε πρωτοταξική με  $t_{1/2} \approx 15$  min (π.χ. Oberle et al. 1990, Kelly et al. 2003). Κατά τη διάρκεια κάθε δεκαπεντάλεπτου διαστήματος, η κένωση θεωρήθηκε ότι λάμβανε χώρα με σταθερό ρυθμό (Πίνακας Β.2). Με βάση τα ενδοαυλικά δεδομένα που συλλέχθηκαν στην κλινική μελέτη, συνεχής μείωση της ενδοαυλικής συγκέντρωσης τόσο για τη DPD όσο και για την KCZ (πιθανότατα, λόγω της ταχύτατης απορρόφησης των λιπόφιλων δραστικών ουσιών και της γρήγορης μεταφοράς των περιεχομένων του δωδεκαδάκτυλου προς τη νήστιδα), προσομοιώθηκε μετρώντας τις συγκεντρώσεις στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά τη διάρκεια ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος ανεξάρτητα από το προηγούμενο και το επόμενο δεκαπεντάλεπτο διάστημα, δηλ. με ξεχωριστό πείραμα. Κατά τη διάρκεια κάθε δεκαπεντάλεπτου πειράματος, ένα δείγμα συλλέχθηκε στο μέσο του διαστήματος, δηλ. στα 7,5 min από την έναρξη του πειράματος.

Κάθε δείγμα χωρίστηκε σε 3 μέρη. Το πρώτο φυγοκεντρήθηκε (37 °C, 12560 × g, 10 min) και το στερεό συλλέχθηκε για ανάλυση της δομής του με την τεχνική XRPD, όπως περιγράφηκε για τα στερεά που συλλέχθηκαν ενδοαυλικά (Κεφ. Β.5.4). Τα ιζήματα χωρίς να προηγηθεί ξήρανση αποθηκεύτηκαν στους -70 °C μέχρι την ημέρα ανάλυσης. Στο δεύτερο μέρος προσδιορίστηκε η συνολική περιεκτικότητα σε δραστική ουσία (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη), μετά από κατάλληλη αραιώση με κινητή φάση,  $C_i$ . Το τρίτο μέρος διηθήθηκε αμέσως μετά τη συλλογή του μέσω ηθμών RC 0,45 μm (DPD, KCZ και AZD), και μέσω ηθμών PTFE 0,45 μm (SB), αφού προηγήθηκε κορεσμός των ηθμών (Παράρτημα 7), και το διήθημα χωρίστηκε σε τρία μέρη.

**Πίνακας Β.2:** Όγκοι που θεωρητικά αδειάζουν από το στόμαχο ενός ενήλικα κατά τη διαπεπτική περίοδο σε διάφορα δεκαπεντάλεπτα διαστήματα μετά τη χορήγηση 240 mL υδατικού διαλύματος χωρίς θερμιδικό περιεχόμενο\* και όγκοι που αδειάζουν από το γαστρικό διαμέρισμα κατά τη διάρκεια των *in vitro* πειραμάτων σε διάφορα δεκαπεντάλεπτα διαστήματα από την έναρξη της κένωσης 250 mL ίδιου διαλύματος.

Χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης (min)	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
	Συνολικός όγκος που θεωρητικά έχει αδειάσει από το στόμαχο στο τέλος του δεκαπενταλέπτου (mL)	Ρυθμός ροής από το γαστρικό διαμέρισμα (mL/min)	Συνολικός όγκος που έχει αδειάσει από το γαστρικό διαμέρισμα στο τέλος του δεκαπενταλέπτου (mL)
0-15	125	8	120
15-30	62	4	60
30-45	32	2	30
45-60	16	1	15
60-75	8	0,5	7

\* Ο υπολειπόμενος όγκος στο στόμαχο κατά τη διαπεπτική περίοδο θεωρήθηκε 10 mL.

Στο πρώτο μέρος, μετά από κατάλληλη αραίωση με κινητή φάση, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας,  $C$ . Το δεύτερο μέρος επώαστηκε (37 °C, 48 h, 75 oscillations/min) σε υάλινους περιέκτες και μετά, από διήθηση μέσω ηθμών 0,45 μm και κατάλληλη αραίωση με κινητή φάση, αναλύθηκε, ώστε να προσδιοριστεί το περιεχόμενό του σε δραστική ουσία,  $C_{inc}$ . Το τρίτο μέρος του διηθήματος επώαστηκε (37 °C, 48 h, 75 oscillations/min) σε υάλινους περιέκτες παρουσία περίσσειας σκόνης της δραστικής ουσίας, η οποία είχε ίδια δομή με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων και των εναιωρημάτων, που τοποθετήθηκαν στο γαστρικό διαμέρισμα. Στη συνέχεια, ακολούθησε διήθηση μέσω ηθμών 0,45 μm και

κατάλληλη αραίωση με κινητή φάση και προσδιορίστηκε η θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της δραστικής ουσίας στο κάθε δείγμα,  $C_s$ .

Η επιλογή των ηθμών βασίστηκε στην περιορισμένη προσρόφηση, όπως αυτή έχει επιβεβαιωθεί σε παλιότερες μελέτες για τις DPD και KCZ (Kalantzi et al. 2006b, Vertzoni et al. 2007) ή με προκαταρκτικά πειράματα για τις AZD and SB. Συγκεκριμένα, για τα πειράματα με AZD και SB χρησιμοποιήθηκαν υάλινοι περιέκτες και σύριγγες σε όλα τα στάδια του πειράματος, διότι η δραστική ουσία AZD αποδείχτηκε ότι προσροφάται στους πλαστικούς περιέκτες (Παράρτημα 8) και για να αποφευχθεί πιθανή προσρόφηση της δραστικής ουσίας SB στους πλαστικούς περιέκτες. Τέλος, πριν από την έναρξη των *in vitro* πειραμάτων αξιολογήθηκε η προσρόφηση της ουσίας AZD στους ηθμούς RC και η σταθερότητα της στο FaSSIF-V2plus (Παράρτημα 8), καθώς και αξιολογήθηκε η προσρόφηση της ουσίας SB στους ηθμούς RC και PTFE και η σταθερότητά της στο FaSSIF-V2plus (Παράρτημα 9).

Για όλες τις δραστικές ουσίες, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για κάθε δραστική ουσία, οι τιμές θερμοδυναμικής διαλυτότητας στα διηθήματα, τα οποία αντιστοιχούσαν στα διάφορα χρονικά διαστήματα, ήταν παρόμοιες και ο συντελεστής μεταβλητότητας ανά χρονικό διάστημα κυμαινόταν, ανάλογα με τη δραστική ουσία, από 2,32 % έως 11,5 %. Γι' αυτόν το λόγο, η διαλυτότητα κατά τη διάρκεια ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος προσδιορίστηκε με μέτρηση μόνο σε ένα διήθημα. Λόγω του γεγονότος ότι ο συντελεστής μεταβλητότητας των τιμών των συγκεντρώσεων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα σε κάθε χρονικό διάστημα ήταν, επίσης, πολύ μικρός (0,92-13,5 % για όλες τις δραστικές ουσίες), η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας μετά από επώαση (48h/37°C) προσδιορίστηκε με μέτρηση μόνο σε ένα διήθημα.

Τα *in vitro* δεδομένα της παρουσίας των δραστικών ουσιών στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα παρουσιάζονται ως μέσες±τυπική απόκλιση τιμές. Τα κλάσματα καθίζησης στα *in vitro* δείγματα,  $\pi_{in\ vitro}$ , και οι αντίστοιχοι δείκτες υπερκορεσμού,  $\sigma_{in\ vitro}$ , υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις A.11 και A.7. Τα κλάσματα καθίζησης μετά την επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων από τα *in vitro* πειράματα,  $\pi_{in\ vitro}^{inc}$ , και οι αντίστοιχοι δείκτες υπερκορεσμού,  $\sigma_{in\ vitro}^{inc}$ , υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις B.1 και

B.2, αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές των κλασμάτων καθίζησης ακολουθούσαν κανονική κατανομή [SigmaStat 3,5 (SPSS Science Inc., Η.Π.Α.)]. Η σημαντικότητα των κλασμάτων καθίζησης αξιολογήθηκε με μονόπλευρη δοκιμασία t ενός δείγματος. Το σφάλμα τύπου I ορίστηκε 0,05 [S-Plus 4,5, Insightful Corporation (Η.Π.Α.)].

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

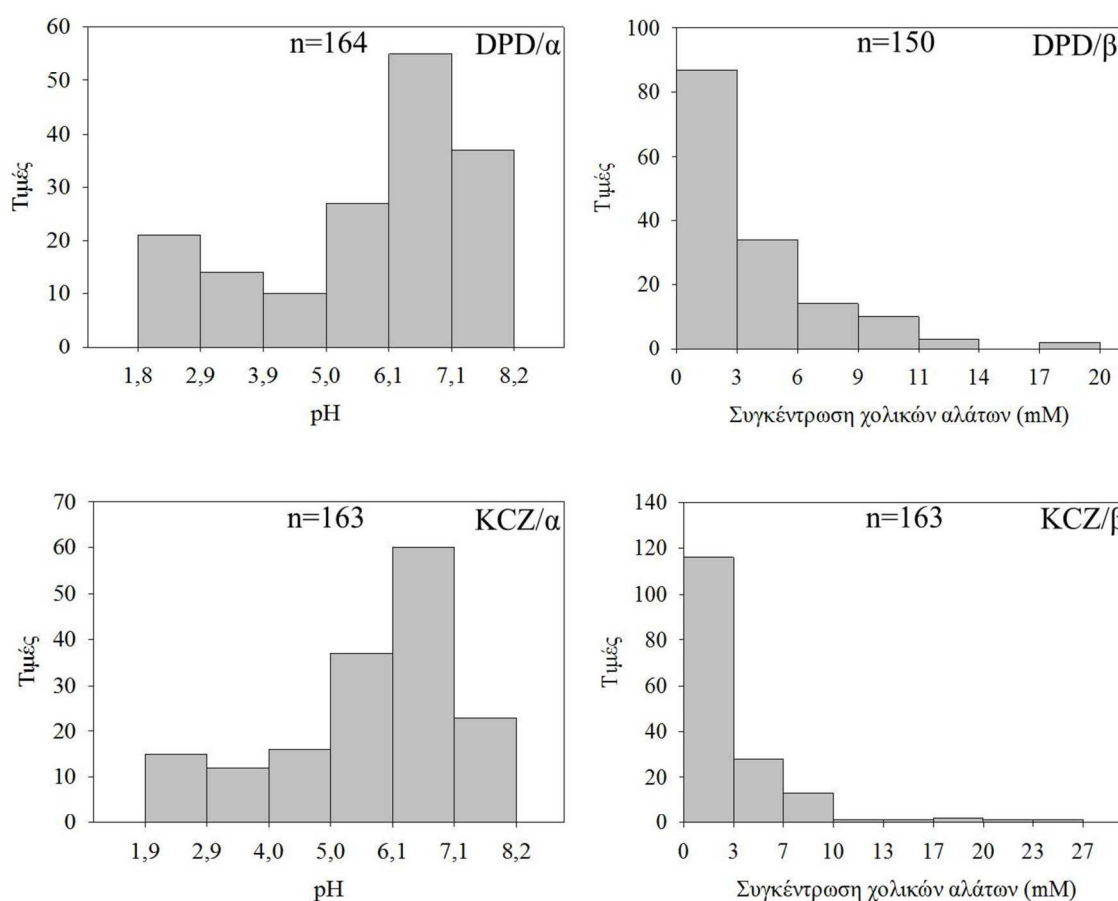
Όλα τα πρωτογενή δεδομένα, καθώς και τα κλάσματα καθίζησης και υπερκορεσμού παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα 10.

Γ.1 Το περιβάλλον στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου μετά τη χορήγηση των διαλυμάτων διπυριδαμόλης και κετοκοναζόλης κατά τη διαπεπτική περίοδο

Σε κάθε φάση χορήγησης, η κατανομή των τιμών pH των αναρροφηθέντων δειγμάτων από το ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου δεν ήταν κανονική λόγω της ύπαρξης δειγμάτων με ιδιαίτερα όξινες τιμές pH (Σχήμα Γ.1). Οι διάμεσες τιμές pH (Πίνακας Γ.1) ήταν παρόμοιες με αυτές που είχαν καταγραφεί μετά τη χορήγηση 250 mL νερού (Kalantzi et al. 2006a). Αυτό είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι η τελική τιμή pH του διαλύματος που προκύπτει μετά την προσθήκη 240 mL νερού ΑΥΡΑ® σε 15 mL υδροχλωρικού διαλύματος pH 1,8 (περιεχόμενο στομάχου κατά τη διαπεπτική περίοδο) είναι 3,0, και είναι παρόμοια με την τιμή pH 2,6 που προκύπτει μετά την ανάμιξη 240 mL υδροχλωρικών διαλυμάτων με pH 2,7 (χορηγήθηκαν στην κλινική μελέτη της παρούσας εργασίας) με 15 mL υδροχλωρικού διαλύματος pH 1,8. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι η χορήγηση όξινων διαλυμάτων (απαραίτητη προϋπόθεση, ώστε να διαλυθεί η χορηγηθείσα δόση) δεν επηρέασε σε σημαντικό βαθμό το pH στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου.

Η κατανομή των συγκεντρώσεων των χολικών αλάτων στα αναρροφηθέντα δείγματα δεν ήταν κανονική, λόγω της ύπαρξης δειγμάτων με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις χολικών αλάτων (Σχήμα Γ.1). Η μέση συγκέντρωση των χολικών αλάτων (Πίνακας Γ.1) ήταν κατάτι υψηλότερη από αυτή που προσδιορίστηκε από τους Persson et al. [2 mM] (Persson et al. 2005) και μικρότερη από τις τιμές, που αναφέρουν οι Bevernage et al. [5,4 mM] (Bevernage et al. 2010). Οι διαφορές μπορεί να σχετίζονται με το μικρότερο αριθμό εθελοντών που έλαβαν μέρος στις προηγούμενες μελέτες, ή/και με διαφορές στα πρωτόκολλα των μελετών. Οι διάμεσες

τιμές (Πίνακας Γ.1) ήταν σύμφωνες με αντίστοιχες διάμεσες τιμές, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Clarysse et al. 2009a). Η ολική % μέση(Τυπική Απόκλιση) σχετική σύνθεση των χολικών αλάτων στο σύνολο των αναρροφηθέντων δειγμάτων ήταν 11,9(5,7) % TC, 36(12) % GC, 9,7(5,4) % TCDC, 5,0(5,8) % UDC, 24,1(8,8) % GCDC και 12,5(9,4) % GDC. Σε δύο εθελοντές ανιχνεύθηκαν ελάχιστες ποσότητες C. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο επικρατούν το γλυκοχολικό και γλυκοηνοδεοξυχολικό άλας (Persson et al. 2005, Brouwers et al. 2006, Bevernage et al. 2010).



**Σχήμα Γ.3:** Η κατανομή των τιμών pH (α) και των συγκεντρώσεων των χολικών αλάτων (β) στα αναρροφηθέντα δείγματα της πρώτης πειραματικής ημέρας (χορήγηση διαλυμάτων DPD, άνω γραφήματα) και της δεύτερης πειραματικής ημέρας (χορήγηση διαλυμάτων KCZ, κάτω γραφήματα). n είναι το πλήθος των τιμών που απαρτίζουν την κατανομή.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της λεκιθίνης στα αναρροφηθέντα δείγματα ήταν με τη μορφή της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και οι μέσες τιμές (Πίνακας Γ.1) ήταν σύμφωνες με τις αντίστοιχες που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [0,2 mM, (Persson et al. 2005)]. Οι διάμεσες τιμές (Πίνακας Γ.1) ήταν μικρότερες από αυτές που αναφέρονται από τους Clarysse et al. [0,6 mM] (Clarysse et al. 2009a). Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται τόσο στο μικρότερο αριθμό εθελοντών που έλαβαν μέρος στην προηγούμενη μελέτη, όσο και στη διαφορετική μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης της λεκιθίνης μεταξύ των δύο μελετών. Υπενθυμίζεται ότι οι Clarysse et al. προσδιόρισαν τη συγκέντρωση της λεκιθίνης με εμπορικά διαθέσιμο κιτίο, ενώ στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση της λεκιθίνης προσδιορίστηκε με μέθοδο HPLC-CAD.

Οι μέσες τιμές των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Πίνακας Γ.1) ήταν παρόμοιες με αντίστοιχες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία [0,6 mM] (Armand et al. 1996). Οι διάμεσες τιμές ήταν κατάτι μικρότερες από αυτές που προσδιορίστηκαν σε παλιότερη μελέτη από μικρότερο αριθμό αναρροφηθέντων δειγμάτων [0,5 mM] (Clarysse et al. 2009a).

Οι μέσες τιμές μονογλυκεριδίου και χοληστερόλης (Πίνακας Γ.1) ήταν υψηλότερες από προηγούμενες αντίστοιχες τιμές οι οποίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Οι Persson et al. (Persson et al. 2005) προσδιόρισαν, ότι η μέση συγκέντρωση μονογλυκεριδίου και η μέση συγκέντρωση χοληστερόλης ήταν περίπου 0,001 mM και 0,006 mM, αντίστοιχα. Τέλος, η μέση τιμή του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου (Πίνακας Γ.1) ήταν, επίσης, κατάτι μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία [2,1 mg/mL (Lindahl et al. 1997), 7,5 mg/mL (Persson et al. 2005) και 3,1 mg/mL (Kalantzi et al. 2006a)].

**Πίνακας Γ.1:** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εντερικών υγρών του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου υγιών εθελοντών κατά τη διαπαιτική περίοδο κατά τη διάρκεια των πρώτων 70 min μετά τη χορήγηση των διαλυμάτων DPD και KCZ.<sup>α</sup>

	DPD-L	DPD-H	KCZ-L	KCZ-H
pH	5,8±1,9 6,5(1,9-8,2)	5,7±1,7 6,3(1,8-8,1)	5,7±1,7 6,2(1,9-8,2)	5,6±1,4 6,0(2,3-7,7)
Ολικά χολικά άλατα (mM) <sup>β</sup>	3,0±3,5 1,6(0,019-17,8)	3,6±3,8 2,5(0,034-19,9)	2,9±4,3 1,3(0,039-26,8)	3,0±3,8 2,0[LOQ(=0,002)-19,9]
Λεκθίνη (mM) <sup>γ</sup>	0,26±0,36 0,054[LOQ(=0,004)-1,30]	0,25±0,40 0,025[LOQ(=0,004)-1,70]	0,18±0,33 0,046[LOQ(=0,004)-2,13]	0,28±0,42 0,091[LOQ(=0,004)-1,95]
Ελεύθερα λιπαρά οξέα (mM) <sup>δ</sup>	0,54±0,69 0,23[LOQ(=0,005)-3,12]	0,6±1,0 0,13[LOQ(=0,005)-4,8]	0,39±0,70 0,15[LOQ(=0,005)-4,73]	0,50±0,63 0,22[LOQ(=0,005)-2,41]
Μονογλυκερίδιο (mM)	0,021±0,039 0,0063[LOQ(=0,0024)-0,184]	0,019±0,041 0,0035[LOQ(=0,0024)-0,183]	0,014±0,031 0,013[LOQ(=0,0024)-0,187]	0,018±0,029 0,051[LOQ(=0,0024)-0,128]
Χοληστερόλη (mM)	0,23±0,31 0,10[LOQ(=0,001)-1,35]	0,28±0,39 0,083[LOQ(=0,001)-1,53]	0,18±0,26 0,077[LOQ(=0,001)-1,57]	0,22±0,27 0,078[LOQ(=0,001)-1,12]
Ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο (mg/mL)	1,09±0,69 0,98(0,24-2,93)	1,54±0,84 1,42(0,23-4,85)	1,06±0,66 0,88(0,29-3,75)	1,49±0,78 1,29(0,39-4,89)

<sup>α</sup> Ανάλογα με την παράμετρο, τα δεδομένα σε κάθε κελί έχουν συλλεχθεί από 48-89 μεμονωμένα αναρροφηθέντα δείγματα. Σε κάθε κελί, οι πάνω αριθμοί δείχνουν μέσο±τυπική απόκλιση, ενώ οι κάτω διάμεσο(εύρος), και LOQ: Limit of Quantitation (όριο ποσοτικοποίησης)

<sup>β</sup> Άθροισμα μοριακών συγκεντρώσεων TC, GC, TCDC, UDC, GCDC, GDC και C

<sup>γ</sup> Άθροισμα μοριακών συγκεντρώσεων φωσφατιδυλοχολίνης και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης

<sup>δ</sup> Άθροισμα μοριακών συγκεντρώσεων του λινελαϊκού, παλμιτικού και στεατικού οξέος

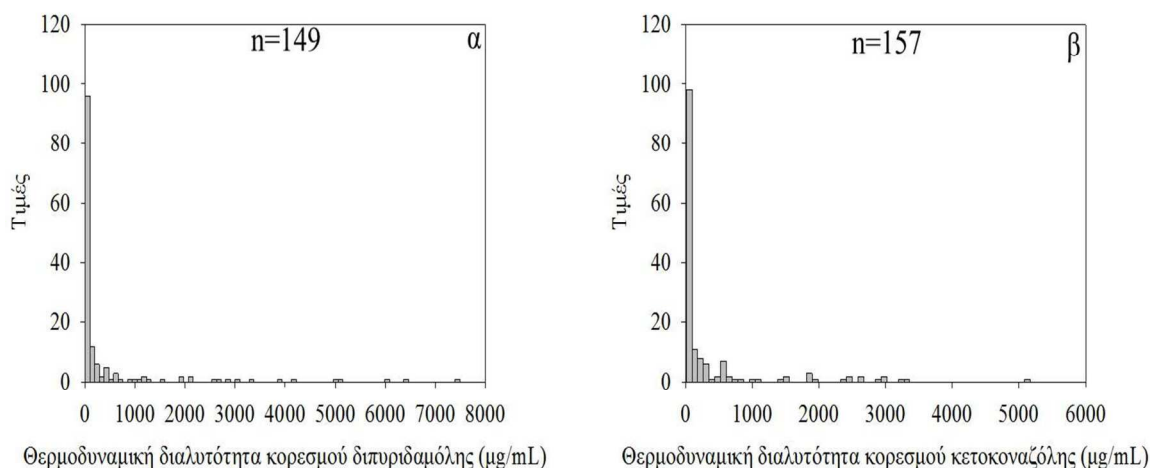


## Γ.2 Θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού της διπυριδαμόλης και της κετοκοναζόλης στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από το ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου υγιών εθελοντών κατά τη διαπεπτική περίοδο

Στα αναρροφηθέντα δείγματα με αρχική τιμή  $pH \leq 3,6$  (54 από τα 336 συνολικά αναρροφηθέντα δείγματα) η τιμή  $pH$  στην ισορροπία ήταν 0,8-1,6 μονάδες υψηλότερη από την αρχική τιμή  $pH$ . Για αυτόν το λόγο, η χρήση των σχετικών δεδομένων διαλυτότητας στον προσδιορισμό του δείκτη υπερκορεσμού στα ενδοαυλικά περιεχόμενα καθίσταται προβληματική. Αντίθετα, σε τιμές  $pH > 3,6$ , η μεταβολή της τιμής  $pH$  στην ισορροπία είναι πολύ περιορισμένη, και ακόμη, αν υπάρχει, η επίδραση στη διαλυτότητα είναι περιορισμένη. Σε αυτές τις τιμές  $pH$ , άλλοι παράγοντες, όπως τα χολικά άλατα και άλλοι παράγοντες διαλυτοποίησης, καθορίζουν τη διαλυτότητα κορεσμού. Για αυτό, ο δείκτης υπερκορεσμού των ενδοαυλικών περιεχομένων υπολογίστηκε μόνο για δείγματα με τιμές  $pH > 3,6$ .

Ωστόσο, το σφάλμα στον προσδιορισμό της μέσης ή της διάμεσης τιμής διαλυτότητας θα ήταν πολύ μεγαλύτερο, αν δεν λαμβάνονταν υπόψη και τα δεδομένα διαλυτότητας σε δείγματα με αρχική τιμή  $pH \leq 3,6$ . Έτσι, η εκτίμηση της μέσης διαλυτότητας και η σύγκρισή της με αντίστοιχες τιμές στη βιβλιογραφία έγινε συμπεριλαμβάνοντας όλες τις διαθέσιμες τιμές ( $n=336$ ). Οι μέσες τιμές (Τυπική απόκλιση) διαλυτότητας κορεσμού της DPD στα αναρροφηθέντα δείγματα μετά τις χορηγήσεις των DPD-L και DPD-H ήταν 469(1039)  $\mu\text{g/mL}$  και 614(1450)  $\mu\text{g/mL}$ , αντίστοιχα, ενώ οι διάμεσες τιμές (εύρος) ήταν 51(8-5119)  $\mu\text{g/mL}$  και 83(10-7491)  $\mu\text{g/mL}$ , αντίστοιχα. Για την KCZ, η μέση τιμή (Τυπική απόκλιση) διαλυτότητας κορεσμού μετά από τη χορήγηση της μικρής και της μεγάλης δόσης ήταν 449(941)  $\mu\text{g/mL}$  και 404(769)  $\mu\text{g/mL}$ , αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες διάμεσες τιμές (εύρος) ήταν 36(10-5166)  $\mu\text{g/mL}$  και 73(9-3219)  $\mu\text{g/mL}$ . Οι μέσες τιμές διαλυτότητας κορεσμού της KCZ δε διέφεραν από αντίστοιχες τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Clarysse et al. 2009b). Το ίδιο ισχύει και για τις διάμεσες τιμές διαλυτότητας κορεσμού της DPD και της KCZ, οι οποίες ήταν παρόμοιες με αντίστοιχες τιμές από πειράματα διαλυτότητας σε συνενωμένα αναρροφηθέντα δείγματα εντερικού υγρού από υγιείς εθελοντές κατά τη διαπεπτική περίοδο (Kalantzi et al. 2006b). Δεδομένου ότι οι κατανομές των τιμών διαλυτότητας κορεσμού της

DPD και της KCZ στα αναρροφηθέντα δείγματα της παρούσας μελέτης δεν ακολουθούν κανονική κατανομή (Σχήμα Γ.2), μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι μέσες τιμές των δεδομένων διαλυτότητας δεν είναι αντιπροσωπευτικές της μέσης διαλυτότητας κορεσμού των δύο αυτών δραστικών ουσιών.

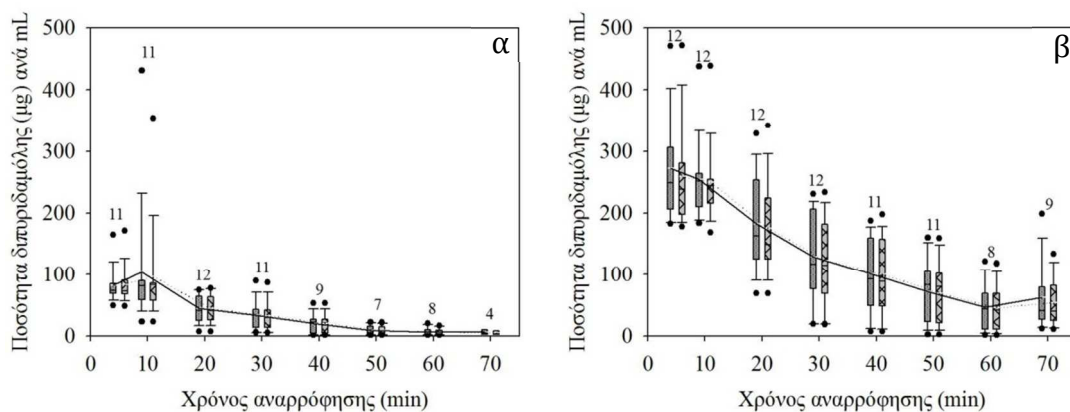


**Σχήμα Γ.2:** Η κατανομή των τιμών θερμοδυναμικής διαλυτότητας κορεσμού της DPD (α) και της KCZ (β) στα αναρροφηθέντα δείγματα της κλινικής μελέτης. n είναι το πλήθος των τιμών που απαρτίζουν την κατανομή.

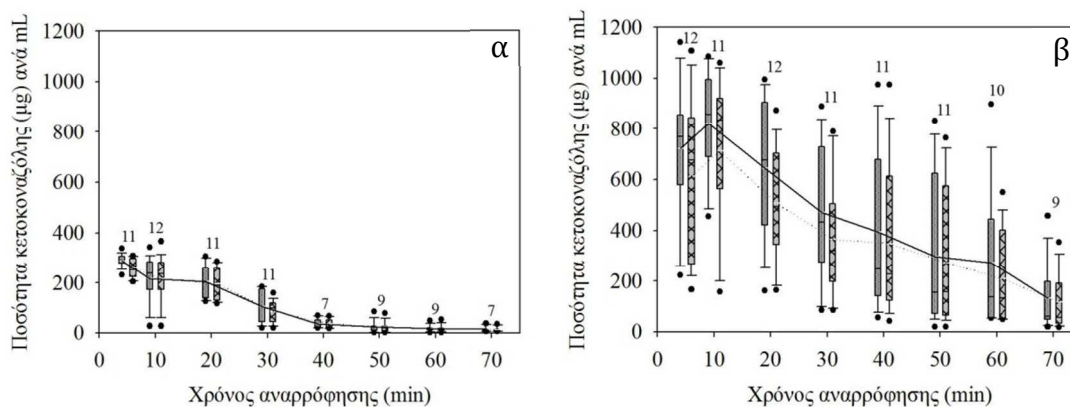
Για τη DPD και τη KCZ, οι διαλυτότητες κορεσμού στα αναρροφηθέντα δείγματα με αρχική τιμή  $pH \geq pK_a$  συζυγούς οξέος είχαν γραμμική συσχέτιση με τη συγκέντρωση των ολικών χολικών αλάτων [ $R^2=0,74$  (DPD) και  $0,78$  (KCZ)]. Οι συσχετίσεις βελτιώθηκαν ελάχιστα, όταν αντί της συγκέντρωσης των ολικών χολικών αλάτων χρησιμοποιήθηκε η ολική μικκυλιακή συγκέντρωση.

### Γ.3 Καθίζηση και υπερκορεσμός των περιεχομένων ενδοαυτικά μετά τη χορήγηση των διαλυμάτων διπυριδαμόλης και κετοκοναζόλης

Η συνολική ποσότητα (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) δραστικής ουσίας ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος από το ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου,  $C_t$ , και η αντίστοιχη συγκέντρωση στο υπερκείμενο,  $C$ , σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση σε υγιείς εθελοντές κατά τη διαπεπτική περίοδο παρουσιάζονται στα Σχήματα Γ.3 (DPD) και Γ.4 (KCZ).



**Σχήμα Γ.3:** Συνολική ποσότητα (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) DPD ανά mL,  $C_t$  (γκρι θηκογράμματα), και συγκέντρωση DPD,  $C$  (γραμμωτά γκρι θηκογράμματα), στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου μετά τη χορήγηση DPD-L (α) και DPD-H (β) σε υγιείς ενήλικες κατά τη διαπεπτική περίοδο. Οι αριθμοί των ενηλίκων, οι οποίοι συνεισέφεραν στην κατασκευή του κάθε ζεύγους θηκογραμμάτων αναγράφονται πάνω από κάθε ζεύγος. Η συνεχής γραμμή συνδέει τις μέσες τιμές των δεδομένων  $C_t$  και η διακεκομμένη τις αντίστοιχες τιμές των δεδομένων  $C$ .



**Σχήμα Γ.4:** Συνολική ποσότητα (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) KCZ ανά mL,  $C_t$  (γκρι θηκογράμματα), και συγκέντρωση KCZ,  $C$  (γραμμωτά γκρι θηκογράμματα), στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου μετά τη χορήγηση KCZ-L (α) και KCZ-H (β) σε υγιείς ενήλικες κατά τη διαπεπτική περίοδο. Οι αριθμοί των ενηλίκων, οι οποίοι συνεισέφεραν στην κατασκευή του κάθε ζεύγους θηκογραμμάτων αναγράφονται πάνω από κάθε ζεύγος. Η συνεχής γραμμή συνδέει τις μέσες τιμές των δεδομένων  $C_t$  και η διακεκομμένη τις αντίστοιχες τιμές των δεδομένων  $C$ .

Τα κλάσματα καθίζησης και οι δείκτες υπερκορεσμού παρουσιάζονται στους Πίνακες Γ.2 (DPD) και Γ.3 (KCZ).

Στην περίπτωση της DPD, και στις δύο δόσεις η ενδοαυλική καθίζηση ήταν ελάχιστη και το μέσο κλάσμα καθίζησης,  $\overline{\pi_{lumen}}$ , ήταν μέχρι και 7 % (Πίνακας Γ.2). Στατιστικά σημαντικός υπερκορεσμός ( $\sigma > 0$ ) παρατηρήθηκε μέχρι και 10 min μετά τη χορήγηση DPD-L και μέχρι 30 min μετά τη χορήγηση DPD-H. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στατιστικά σημαντική ενδοαυλική καθίζηση παρατηρήθηκε ακόμη και σε περιπτώσεις που τα ενδοαυτικά περιεχόμενα δεν ήταν κορεσμένα από τη φάση της DPD, που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των χορηγηθέντων διαλυμάτων (DPD-L/50 min, Πίνακας Γ.2, δύο πρώτες στήλες). Παρόμοια παρατήρηση μπορεί να γίνει και για μερικά από τα υπερκείμενα των εντερικών περιεχομένων, τα οποία επώαστηκαν [48h/37°C] (DPD-L/40 min, DPD-L/60 min και DPD-H/60 min, Πίνακας Γ.2, τελευταίες στήλες). Αναλυτική μελέτη περίθλασης ακτίνων X στα ιζήματα που συλλέχθηκαν κατά τις αναρροφήσεις δεν ήταν δυνατό να γίνει με λεπτομέρεια εξαιτίας της μηδαμινής διαθέσιμης ποσότητας στερεής DPD που καθίζησε ενδοαυτικά. Παρόλα αυτά, γενικά, παρατηρήθηκε άμορφη δομή της DPD ενδοαυτικά μετά τη χορήγηση των δύο διαλυμάτων της. Οι ποσότητες στερεής DPD που καθίζησαν μετά από επώαση (48h/37°C) των υπερκειμένων των αναρροφηθέντων δειγμάτων ήταν επίσης ελάχιστη, διότι παρά τα σημαντικά υψηλά κλάσματα καθίζησης (Πίνακας Γ.2), αυτά αναφέρονται σε πολύ μικρή συνολική ποσότητα DPD στους περιέκτες, που περιείχαν τα δείγματα για επώαση.

**Πίνακας Γ.2:** Μέση τιμή του κλάσματος καθίζησης της DPD στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου,  $\overline{\pi_{lumen}} \pm$ Τυπική απόκλιση (SD), και μέση τιμή του δείκτη υπερκορεσμού,  $\overline{\sigma_{lumen}} \pm$ Τυπική απόκλιση (SD), σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση DPD-L (άνω σειρές) και DPD-H (κάτω σειρές) και οι αντίστοιχες τιμές για τους δείκτες υπερκορεσμού και τα κλάσματα καθίζησης, μετά από επώαση των υπερκειμένων για 48 h στους 37 °C ( $\overline{\sigma_{lumen}^{inc}}$  και  $\overline{\pi_{lumen}^{inc}}$ , αντίστοιχα).<sup>a</sup>

Χρόνος αναρρόφησης (min)	$\overline{\pi_{lumen}} \pm SD$	$\overline{\sigma_{lumen}} \pm SD$	$\overline{\sigma_{lumen}^{inc}} \pm SD$	$\overline{\pi_{lumen}^{inc}} \pm SD$
5	-0,015 ± 0,028	3,1 ± 2,1 <sup>γ</sup>	0,84 ± 0,70 <sup>γ</sup>	0,38 ± 0,27 <sup>β</sup>
	0,05 ± 0,11	4,4 ± 4,3 <sup>γ</sup>	0,41 ± 0,72	0,41 ± 0,34 <sup>β</sup>
10	0,025 ± 0,066	1,3 ± 1,5 <sup>γ</sup>	0,07 ± 0,64	0,36 ± 0,24 <sup>β</sup>
	0,020 ± 0,043	2,9 ± 3,7 <sup>γ</sup>	1,2 ± 2,6	0,31 ± 0,28 <sup>β</sup>
20	-0,005 ± 0,033	-0,02 ± 0,62	-0,24 ± 0,55	0,22 ± 0,15 <sup>β</sup>
	0,031 ± 0,082	1,3 ± 1,6 <sup>γ</sup>	0,65 ± 0,92	0,23 ± 0,17 <sup>β</sup>
30	0,021 ± 0,034 <sup>β</sup>	0,2 ± 1,4	-0,36 ± 0,42	0,24 ± 0,26 <sup>β</sup>
	0,037 ± 0,077	0,9 ± 1,2 <sup>γ</sup>	-0,04 ± 0,46	0,33 ± 0,22 <sup>β</sup>
40	0,011 ± 0,033	-0,53 ± 0,71	-0,80 ± 0,20 <sup>γ</sup>	0,42 ± 0,32 <sup>β</sup>
	0,018 ± 0,050	0,08 ± 0,93	-0,28 ± 0,60	0,19 ± 0,21 <sup>β</sup>
50	0,020 ± 0,016 <sup>β</sup>	-0,83 ± 0,17 <sup>γ</sup>	-0,877 ± 0,084 <sup>γ</sup>	0,16 ± 0,31
	0,051 ± 0,045 <sup>β</sup>	0,4 ± 1,3	0,06 ± 0,63	0,15 ± 0,21 <sup>β</sup>
60	0,07 ± 0,11	-0,89 ± 0,13 <sup>γ</sup>	-0,944 ± 0,061 <sup>γ</sup>	0,40 ± 0,22 <sup>β</sup>
	0,034 ± 0,039 <sup>β</sup>	-0,41 ± 0,48	-0,54 ± 0,32 <sup>γ</sup>	0,24 ± 0,20 <sup>β</sup>
70	0,073 ± 0,093	-0,922 ± 0,056 <sup>γ</sup>	-0,943 ± 0,032 <sup>γ</sup>	0,21 ± 0,25
	0,07 ± 0,11 <sup>β</sup>	-0,14 ± 0,75	-0,40 ± 0,48	0,26 ± 0,17 <sup>β</sup>

<sup>a</sup> Τα κλάσματα καθίζησης εκτιμήθηκαν με τη χρήση όλων των διαθέσιμων δεδομένων, ενώ οι δείκτες υπερκορεσμού εκτιμήθηκαν στα δείγματα, στα οποία η τιμή pH στην ισορροπία δεν διέφερε περισσότερο από 0,5 μονάδες pH από την τιμή pH στην αρχή των πειραμάτων διαλυτότητας, δηλ. αποκλείστηκαν δείγματα με pH ≤ 3,6

<sup>β</sup> Στατιστικά υψηλότερο (p < 0,05) από μηδέν, σύμφωνα με δοκιμασία t ή Wilcoxon

<sup>γ</sup> Στατιστικά διαφορετικό (p < 0,05) από μηδέν, σύμφωνα με δοκιμασία t ή Wilcoxon

Στην περίπτωση της KCZ στατιστικά σημαντική ενδοαυλική καθίζηση παρατηρήθηκε και στις δύο δόσεις, που χορηγήθηκαν. Μετά τη χορήγηση του KCZ-L, το μέσο κλάσμα καθίζησης στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου,  $\overline{\pi_{lumen}}$ , ήταν μέχρι και 11 % (στα 30 min μετά από τη χορήγηση). Μετά τη χορήγηση KCZ-H, το μέσο κλάσμα καθίζησης,  $\overline{\pi_{lumen}}$ , ήταν μέχρι και 16 % (στα 10 και στα 30 min μετά από τη χορήγηση). Τα ενδοαυτικά περιεχόμενα ήταν υπέρκορα μέχρι και 30 min και μέχρι και 50 min μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα. Όπως

και στην περίπτωση της DPD, ενδοαυλική καθίζηση παρατηρήθηκε, ακόμη και σε περιπτώσεις που τα ενδοαυτικά περιεχόμενα δεν ήταν κορεσμένα από τη φάση της KCZ, που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των χορηγηθέντων διαλυμάτων (KCZ-L/60 min και KCZ-L/70 min, Πίνακας Γ.3, πρώτες δύο στήλες). Παρόμοια παρατήρηση έγινε και για το δείγμα KCZ-L/60 min μετά από επώαση [48h/37°C] (Πίνακας Γ.3, δύο τελευταίες στήλες).

**Πίνακας Γ.3:** Μέση τιμή του κλάσματος καθίζησης της KCZ στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου,  $\overline{\pi_{lumen}} \pm$ Τυπική απόκλιση (SD), και μέση τιμή του δείκτη υπερκορεσμού,  $\overline{\sigma_{lumen}} \pm$ Τυπική απόκλιση (SD), σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση KCZ-L (άνω σειρές) και KCZ-H (κάτω σειρές) και οι αντίστοιχες τιμές για τους δείκτες υπερκορεσμού και τα κλάσματα καθίζησης, μετά από επώαση των υπερκειμένων για 48 h στους 37 °C ( $\overline{\sigma_{lumen}^{inc}}$  και  $\overline{\pi_{lumen}^{inc}}$ , αντίστοιχα).<sup>a</sup>

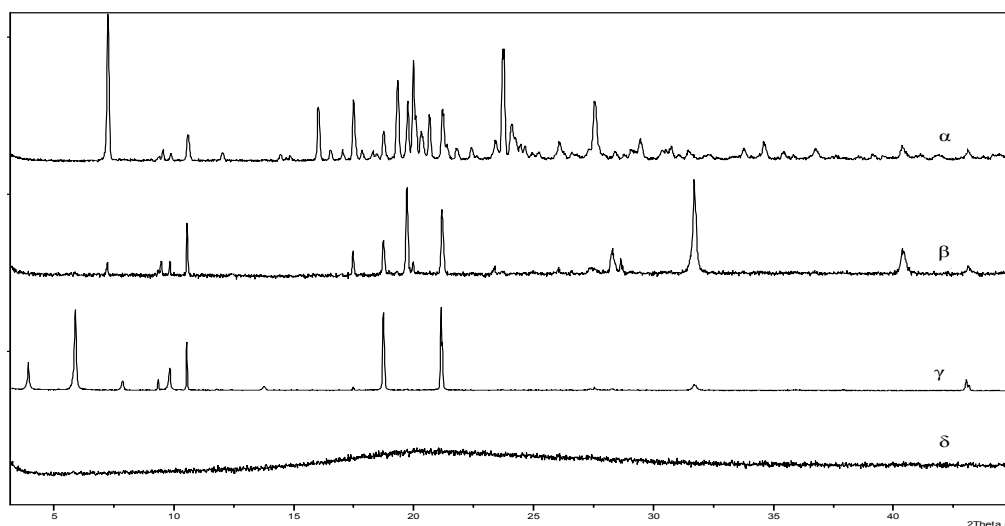
Χρόνος αναρρόφησης (min)	$\overline{\pi_{lumen}} \pm SD$	$\overline{\sigma_{lumen}} \pm SD$	$\overline{\sigma_{lumen}^{inc}} \pm SD$	$\overline{\pi_{lumen}^{inc}} \pm SD$
5	0,10 ± 0,13 <sup>β</sup>	11,5 ± 6,0 <sup>γ</sup>	0,50 ± 0,44 <sup>γ</sup>	0,52 ± 0,41 <sup>β</sup>
	0,14 ± 0,26 <sup>β</sup>	8 ± 11 <sup>γ</sup>	0,58 ± 0,80 <sup>γ</sup>	0,40 ± 0,41 <sup>β</sup>
10	0,003 ± 0,034	7,3 ± 5,1 <sup>γ</sup>	1,0 ± 1,1 <sup>γ</sup>	0,48 ± 0,40 <sup>β</sup>
	0,16 ± 0,26 <sup>β</sup>	17 ± 13 <sup>γ</sup>	0,27 ± 0,23 <sup>γ</sup>	0,73 ± 0,36 <sup>β</sup>
20	0,050 ± 0,049 <sup>β</sup>	6,4 ± 3,6 <sup>γ</sup>	1,29 ± 0,70 <sup>γ</sup>	0,41 ± 0,33 <sup>β</sup>
	0,15 ± 0,24 <sup>β</sup>	9,4 ± 9,3 <sup>γ</sup>	0,30 ± 0,64	0,73 ± 0,30 <sup>β</sup>
30	0,11 ± 0,15 <sup>β</sup>	2,5 ± 2,9 <sup>γ</sup>	0,75 ± 0,74 <sup>γ</sup>	0,24 ± 0,26 <sup>β</sup>
	0,16 ± 0,26 <sup>β</sup>	8,2 ± 7,2 <sup>γ</sup>	0,8 ± 1,2	0,55 ± 0,37 <sup>β</sup>
40	0,039 ± 0,072	0,5 ± 1,6	0,0 ± 1,0	0,24 ± 0,19 <sup>β</sup>
	0,13 ± 0,14 <sup>β</sup>	10 ± 10 <sup>γ</sup>	0,25 ± 0,76	0,48 ± 0,40 <sup>β</sup>
50	0,026 ± 0,041 <sup>β</sup>	-0,30 ± 0,97	-0,51 ± 0,71	0,19 ± 0,12 <sup>β</sup>
	0,090 ± 0,094 <sup>β</sup>	4,9 ± 5,9 <sup>γ</sup>	0,64 ± 0,55 <sup>γ</sup>	0,40 ± 0,32 <sup>β</sup>
60	0,073 ± 0,090 <sup>β</sup>	-0,53 ± 0,25 <sup>γ</sup>	-0,63 ± 0,19 <sup>γ</sup>	0,17 ± 0,11 <sup>β</sup>
	0,13 ± 0,13 <sup>β</sup>	3,0 ± 4,4	-0,20 ± 0,46	0,45 ± 0,40 <sup>β</sup>
70	0,045 ± 0,046 <sup>β</sup>	-0,23 ± 0,79 <sup>γ</sup>	-0,52 ± 0,41	0,24 ± 0,21
	0,12 ± 0,11 <sup>β</sup>	1,6 ± 4,3	0,07 ± 0,92	0,22 ± 0,31 <sup>β</sup>

<sup>a</sup> Τα κλάσματα καθίζησης εκτιμήθηκαν με τη χρήση όλων των διαθέσιμων δεδομένων, ενώ οι δείκτες υπερκορεσμού εκτιμήθηκαν στα δείγματα, στα οποία η τιμή pH στην ισορροπία δε διέφερε περισσότερο από 0,5 μονάδες pH από την τιμή pH στην αρχή των πειραμάτων διαλυτότητας, δηλ. αποκλείστηκαν δείγματα με pH ≤ 3,6

<sup>β</sup> Στατιστικά υψηλότερο (p < 0,05) από μηδέν, σύμφωνα με δοκιμασία t ή Wilcoxon

<sup>γ</sup> Στατιστικά διαφορετικό (p < 0,05) από μηδέν, σύμφωνα με δοκιμασία t ή Wilcoxon

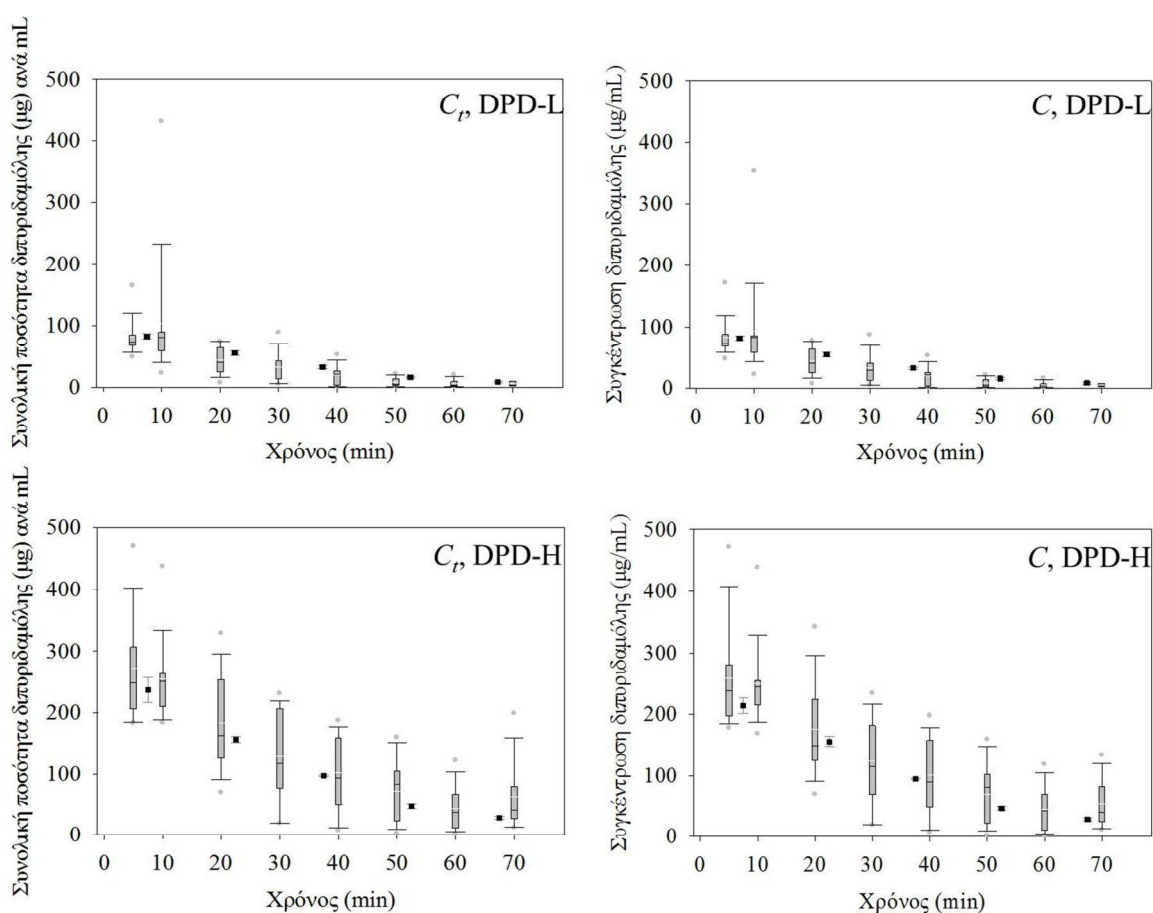
Από τη μελέτη περίθλασης ακτίνων X στα ιζήματα που συλλέχτηκαν κατά τις αναρροφήσεις και μετά την επώαση των υπερκειμένων των δειγμάτων (48h/37°C), φάνηκε ότι μετά τη χορήγηση των διαλυμάτων KCZ μπορούν να δημιουργηθούν τρεις διαφορετικές στερεές δομές: μια κρυσταλλική δομή παρόμοια με το πρότυπο στερεό KCZ που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των χορηγηθέντων διαλυμάτων (Σχήμα Γ.5α και 5β), μια κρυσταλλική δομή, η οποία λόγω της έντονης κορυφής σε μικρή γωνία 2θ (°) μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι πιθανόν να πρόκειται για ένυδρη μορφή [Σχήμα Γ.5γ] (Tian et al. 2007), και μια άμορφη δομή, η οποία ήταν η συνηθέστερα παρατηρούμενη μορφή στα αναρροφηθέντα δείγματα (Σχήμα Γ.5δ). Μετά την επώαση (48h/37°C) των υπερκειμένων των αναρροφηθέντων δειγμάτων, η στερεή μορφή KCZ ήταν πάντα κρυσταλλική και είχε μία από τις δύο αναφερθείσες κρυσταλλικές δομές.



**Σχήμα Γ.5:** Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X σε ιζήματα KCZ. (α) Πρότυπη KCZ (για την παρασκευή των χορηγηθέντων διαλυμάτων και ως περίσσεια στις μετρήσεις διαλυτότητας), (β) Κρυσταλλική δομή, η οποία αντιστοιχεί σε στερεό που συλλέχτηκε μετά από επώαση (48 h, 37 °C, 75 oscillations/min) του υπερκειμένου του δείγματος, το οποίο αναρροφήθηκε 20 min μετά τη χορήγηση KCZ-H στον εθελοντή #4, (γ) Κρυσταλλική δομή, η οποία αντιστοιχεί σε στερεό που συλλέχθηκε μετά από επώαση (48 h, 37 °C, 75 oscillations/min) του υπερκειμένου του δείγματος, το οποίο αναρροφήθηκε 5 min μετά τη χορήγηση KCZ-H στον εθελοντή #1, (δ) Άμορφη δομή, η οποία αντιστοιχεί σε στερεό στο δείγμα, το οποίο αναρροφήθηκε 30 min μετά τη χορήγηση KCZ-H στον εθελοντή #10.

Γ.4 Αναπαραγωγή των ενδοαυλικών συγκεντρώσεων και των κλασμάτων καθίζησης της διπυριδαμόλης με την *in vitro* διάταξη που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής

Η συνολική ποσότητα (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) ανά mL και η συγκέντρωση DPD στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα αντικατοπτρίζουν ικανοποιητικά τα αντίστοιχα ενδοαυτικά δεδομένα μετά τη χορήγηση DPD-L (Σχήμα Γ.6, άνω γραφήματα) και DPD-H (Σχήμα Γ.6, κάτω γραφήματα).



**Σχήμα Γ.6:** Συνολική ποσότητα DPD (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) ανά mL (αριστερά γραφήματα) και συγκέντρωση DPD (δεξιά γραφήματα) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα (■, μέση±τυπική απόκλιση, n=3, *in vitro*) και στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου (θηκογράμματα, n=7-12 *in situ*), σε διάφορες χρονικές στιγμές, μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης DPD-L (άνω γραφήματα) και DPD-H (κάτω γραφήματα).



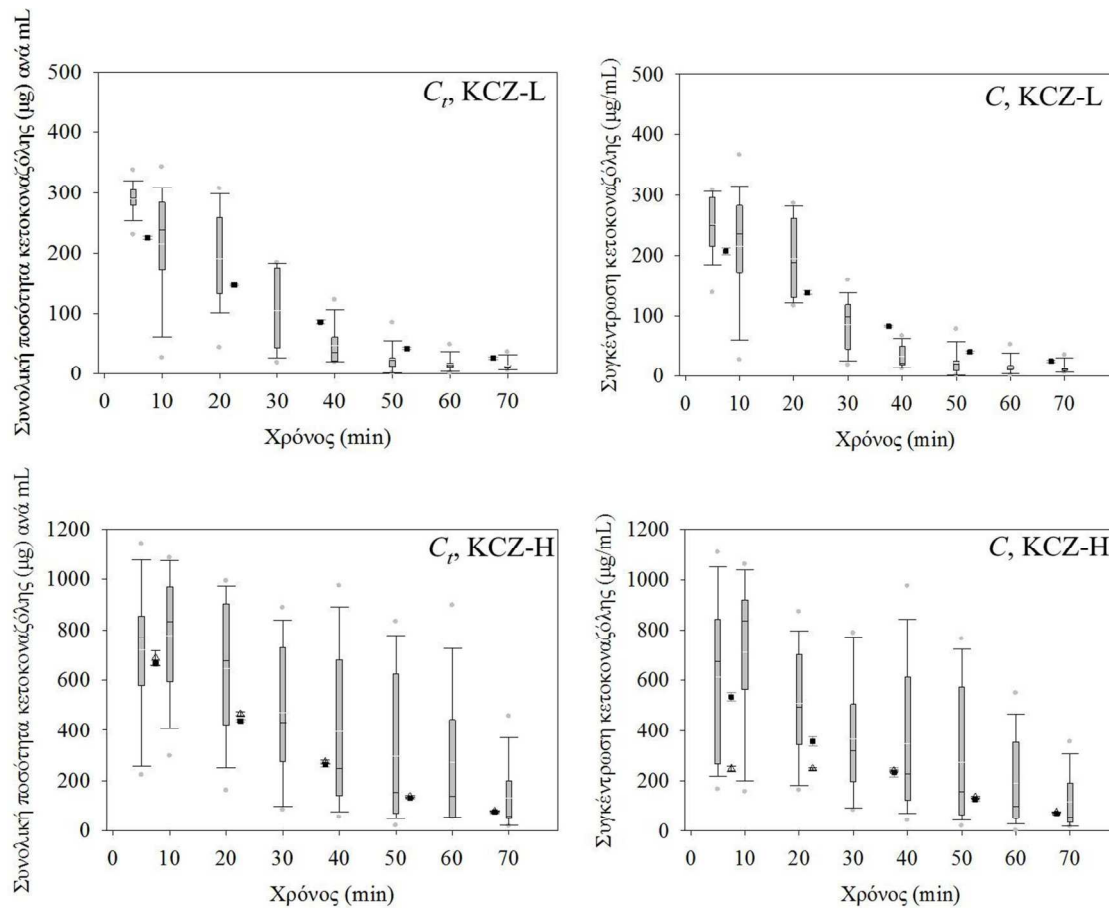
Στατιστικά σημαντική καθίζηση παρατηρήθηκε μόνο κατά την κένωση DPD-H, τόσο ενδοαυτικά (50 min, 60 min και 70 min μετά από χορήγηση), όσο και *in vitro* (στα 0-15 min και 30-45 min χρονικά διαστήματα). Η έλλειψη στατιστικά σημαντικής *in vitro* καθίζησης στο χρονικό διάστημα 15-30 min μπορεί να οφείλεται στα πολύ μικρά κλάσματα καθίζησης. Όμως, τα *in vitro* κλάσματα καθίζησης της DPD ήταν πρακτικά ανύπαρκτα κατά την κένωση DPD-L στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα και μέχρι 0,09 κατά την κένωση DPD-H, και ήταν παρόμοια με τα μέσα ενδοαυτικά δεδομένα, τα οποία ήταν μέχρι και 0,05 μετά τη χορήγηση DPD-L και μέχρι και 0,07 μετά τη χορήγηση DPD-H. Εξαιτίας της μηδαμινής ως περιορισμένης *in vitro* καθίζησης, δεν ήταν δυνατό να συλλεχθεί επαρκές στερεό υλικό DPD, του οποίου η ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X θα οδηγούσε σε ασφαλή συμπεράσματα.

Η μέση θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού (Τυπική απόκλιση) της DPD στο FaSSIF-V2plus (n=3) προσδιορίστηκε 12,919(0,039) μg/mL. Συνεπώς, σύμφωνα με το Σχήμα Γ.6 τα περιεχόμενα του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος είναι υπέρκορα ως προς την ελεύθερη βάση κατά τη διάρκεια της κένωσης DPD-L και DPD-H μέχρι και το χρονικό διάστημα 30-45 min και μέχρι και το χρονικό διάστημα 60-75 min, αντίστοιχα. Αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από τα δεδομένα, τα οποία συλλέχτηκαν μετά την επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων. Συγκεκριμένα, μετά την επώαση, στατιστικά σημαντική καθίζηση παρατηρήθηκε στα δείγματα, τα οποία συλλέχτηκαν κατά την κένωση DPD-L στα χρονικά διαστήματα 0-15, 15-30 και 30-45 min με κλάσματα καθίζησης που κυμαίνονταν από 0,12 ως 0,63. Για τα *in vitro* δείγματα, τα οποία συλλέχτηκαν κατά την κένωση DPD-H και επώαστηκαν (48h/37°C), καθίζηση παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις και τα κλάσματα καθίζησης κυμαίνονταν από 0,19 ως και 0,92. Αυτά τα δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα δεδομένα, τα οποία προέκυψαν από την επώαση των ενδοαυτικών υπερκειμένων, σύμφωνα με τα οποία στατιστικά σημαντική καθίζηση παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα, τα οποία αναρροφήθηκαν κατά την πρώτη ώρα μετά τη χορήγηση DPD-L ή DPD-H και τα κλάσματα καθίζησης ήταν 0,22-0,40 ή 0,15-0,41, αντίστοιχα.

#### Γ.5 Αναπαραγωγή των ενδοαυλικών συγκεντρώσεων και των κλασμάτων καθίζησης της κετοκοναζόλης με την *in vitro* διάταξη που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής

Η συνολική ποσότητα (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) ανά mL και η συγκέντρωση KCZ στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα αντικατοπτρίζουν ικανοποιητικά την αντίστοιχη μέση ενδοαυλική παρουσία της KCZ κατά τη διάρκεια των πρώτων 30 min μετά τη χορήγηση KCZ-L (Σχήμα Γ.7, άνω γραφήματα) και κατά τη διάρκεια των πρώτων 70 min μετά τη χορήγηση KCZ-H (Σχήμα Γ.7, κάτω γραφήματα). Η ενδοαυλική παρουσία της KCZ 40-70 min μετά τη χορήγηση KCZ-L ήταν ελαφρώς υπερεκτιμημένη από τα *in vitro* δεδομένα (Σχήμα Γ.7, άνω γραφήματα). Η χρήση του FaSSIF-V2 αντί του FaSSIF-V2plus στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα δεν οδήγησε σε συγκεντρώσεις KCZ στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν ενδοαυτικά κατά τη διάρκεια των πρώτων 30 min μετά τη χορήγηση KCZ-H (Σχήμα Γ.7, κάτω γραφήματα). Αξίζει να επισημανθεί ότι ακόμα και η χρήση FaSSIF (Galía et al. 1998) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, ενός μέσου με αυξημένη ποσότητα φωσφατιδυλοχολίνης σε σχέση με τα FaSSIF-V2 και FaSSIF-V2plus, δεν οδήγησε σε συγκεντρώσεις KCZ στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα παρόμοιες με αυτές, που παρατηρήθηκαν ενδοαυτικά κατά τη διάρκεια των 70 min μετά τη χορήγηση KCZ-H (Παράρτημα 10, Πίνακας Π10.4.21).

Η μέση θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού (Τυπική απόκλιση) της KCZ (n=3) σε FaSSIF-V2 και σε FaSSIF-V2plus προσδιορίστηκε 14,75(0,90) και 22,78(0,25) µg/mL, αντίστοιχα. Παρόλο, που η διαλυτότητα της KCZ σε FaSSIF-V2plus υποεκτιμάται σε σχέση με τη διάμεση ενδοαυλική διαλυτότητα της KCZ (36-73 µg/mL, ανάλογα με το χρόνο αναρρόφησης από τη στιγμή της χορήγησης 250 mL νερού), είναι κοντύτερα στην ενδοαυλική τιμή σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή σε FaSSIF-V2. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν, ότι το FaSSIF-V2plus είναι καταλληλότερο από το FaSSIF-V2 για να χρησιμοποιηθεί στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ως μέσο, το οποίο προσομοιώνει τα περιεχόμενα του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου υγιών εθελοντών κατά τη διαπετική περίοδο.



**Σχήμα Γ.7:** Συνολική ποσότητα (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) KCZ ανά mL (αριστερά γραφήματα) και συγκέντρωση KCZ (δεξιά γραφήματα) στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα (■, μέση±τυπική απόκλιση, n=3, *in vitro*) και στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου (θηκογράμματα, n=7-12 *in situ*), σε διάφορες χρονικές στιγμές, μετά την έναρξη της γαστρικής κένωσης KCZ-L (άνω γραφήματα) και KCZ-H (κάτω γραφήματα). Τα τρίγωνα (Δ) απεικονίζουν τα δεδομένα, όταν χρησιμοποιήθηκαν FaSSIF-V2 και συμπυκνωμένο FaSSIF-V2 στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα και στο διαμέρισμα δεξαμενή, αντίστοιχα.

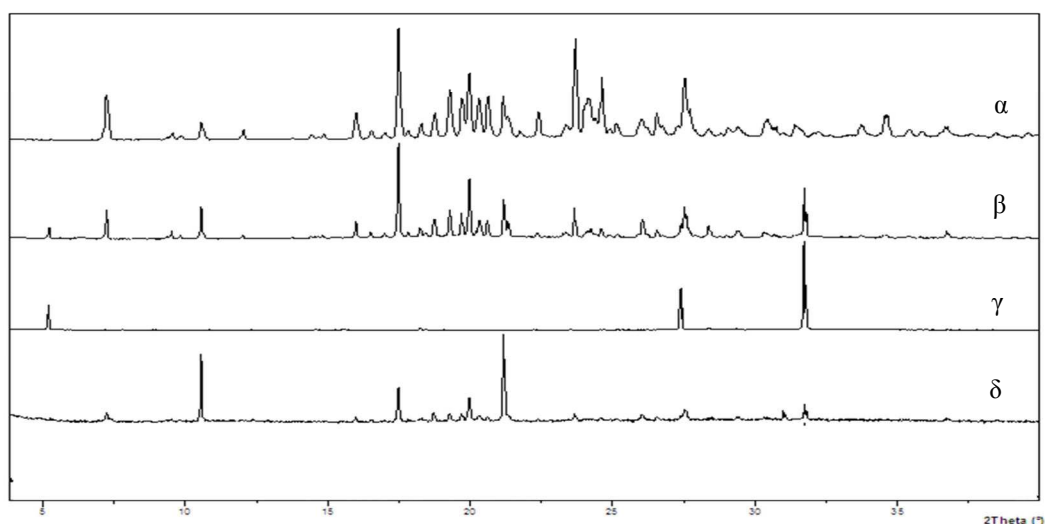
Για το KCZ-L, στατιστικά σημαντική καθίζηση παρατηρήθηκε τόσο ενδοαυτικά (5 min, 20-30 min και 50-70 min μετά τη χορήγηση), όσο και *in vitro* (στο χρονικά διαστήματα 0-15 min και 15-30 min). Για το KCZ-H, στατιστικά σημαντική καθίζηση παρατηρήθηκε *in vivo*, μέχρι και 70 min μετά τη χορήγηση, και *in vitro*, μέχρι και το χρονικό διάστημα 45-60 min. Τα κλάσματα καθίζησης της KCZ *in vitro* ήταν μέχρι και 0,08, στην περίπτωση που στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί

KCZ-L, και μέχρι και 0,20 στην περίπτωση που στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί KCZ-H. Αυτές οι τιμές ήταν παρόμοιες με τα μέσα ενδοαυλικά κλάσματα καθίζησης, τα οποία ήταν μέχρι και 0,11, όταν χορηγήθηκε στους υγιείς εθελοντές KCZ-L, και μέχρι και 0,16, μετά τη χορήγηση KCZ-H. Οι αποκλίσεις από τα *in vivo* δεδομένα και η υψηλή δια-ατομική μεταβλητότητα των ενδοαυλικών δεδομένων μπορεί να σχετίζονται με δυναμικές αλλαγές στην περιοχή, δηλ. με κίνηση των περιεχομένων (και κατ' επέκταση της δραστικής ουσίας) προς ποικίλες κατευθύνσεις. Οι υδροδυναμικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν στα *in vitro* πειράματα [είδος ανάδευσης και όγκος περιεχομένων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα (60 mL)] βασίστηκαν σε προκαταρκτικά πειράματα (Παράρτημα 7) και αποτελούν ένα συμψηφισμό μεταξύ βιοσχετικότητας (biorelevance) [ο όγκος υγρών στο λεπτό έντερο υγιών εθελοντών κατά τη διαπεπτική περίοδο είναι μεταξύ 45 και 319 mL (Schiller et al. 2005)] και της ανάγκης να ληφθούν υπόψη η ταχύτατη διάβαση του δωδεκαδάκτυλου και η απορρόφησης των υψηλής διαπερατότητας δραστικών ουσιών.

Με βάση τα δεδομένα διαλυτότητας κορεσμού στο FaSSIF-V2plus [22,78(0,25)  $\mu\text{g/mL}$ ] και το Σχήμα Γ.7, τα περιεχόμενα του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος ήταν υπέρκορα ως προς την ελεύθερη βάση κατά τη γαστρική κένωση KCZ-L και KCZ-H. Αυτό επιβεβαιώθηκε από τα δεδομένα μετά από την επώαση (48h/37°C) των *in vitro* διηθημάτων. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική καθίζηση παρατηρήθηκε στα δείγματα, τα οποία συλλέχτηκαν σε όλα τα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της κένωσης KCZ-L ή KCZ-H, με τα κλάσματα καθίζησης να κυμαίνονται από 0,15 ως 0,90 ή από 0,30 ως 0,96, αντίστοιχα. Αυτά τα δεδομένα είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα, τα οποία συλλέχτηκαν από την επώαση (48h/37°C) των ενδοαυλικών υπερκειμένων και καταδεικνύουν στατιστικά σημαντική καθίζηση σε όλα τα δείγματα, τα οποία αναρροφήθηκαν κατά τη διάρκεια της πρώτης ώρας μετά τη χορήγηση KCZ-L ή KCZ-H, με κλάσματα καθίζησης που κυμαίνονταν από 0,17-0,52 ή 0,22-0,73, αντίστοιχα (Πίνακας Γ.3).

Η διαφορά σχεδόν όλων των φασμάτων περίθλασης ακτίνων X στη στερεή KCZ που συλλέχθηκε από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά τη διάρκεια των *in vitro* πειραμάτων, σε σχέση με το αντίστοιχο φάσμα της KCZ σκόνης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων, είναι οι επιπρόσθετες κορυφές

στις περίπου  $5^\circ$  και  $32^\circ 2\theta$ , εξαιτίας, πιθανόν, ενός οργανικού υλικού (π.χ. μιας εναλλακτικής στερεάς μορφής της KCZ) και ανόργανων αλάτων (π.χ. NaCl), αντίστοιχα. Συνολικά, δύο διαφορετικές κρυσταλλικές δομές KCZ καθιζάνουν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά την κένωση KCZ-H. Η μία αντιστοιχεί στη δομή της KCZ που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του KCZ-H (Σχήμα Γ.8, α vs. β), και η δεύτερη παρουσιάζει μια χαρακτηριστική κορυφή στις  $5,2^\circ 2\theta$  (Σχήμα Γ.8, α vs. γ). Υπενθυμίζεται ότι η στερεή σκόνη KCZ που συλλέχτηκε λόγω της ενδοαυλικής καθίζησης είχε κυρίως άμορφη δομή (Σχήμα Γ.5δ). Μετά την επώαση (48h/37°C) των *in vitro* διηθημάτων, η στερεή KCZ που συλλέχτηκε ήταν πάντα κρυσταλλική, και κυριαρχούσε η δομή αναφοράς (Σχήμα Γ.8, α vs. δ). Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν στην περίπτωση των στερεών KCZ, τα οποία συλλέχτηκαν μετά την επώαση (48h/37°C) των ενδοαυλικών υπερκειμένων. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας σημαντικός αριθμός κορυφών ( $17^\circ$ - $30^\circ 2\theta$ ) λείπει από πολλά από τα φάσματα των στερεών που συλλέχτηκαν *in vitro* (Σχήμα Γ.8, α vs. β, γ, δ), εξαιτίας της διάταξης των σωματιδίων που προτιμήθηκε για τη λήψη των φασμάτων. Λόγω της μειωμένης ποσότητας διαθέσιμου στερεού δείγματος δεν ήταν εφικτές εναλλακτικές τεχνικές προετοιμασίας του δείγματος για τη λήψη κι άλλων φασμάτων.



**Σχήμα Γ.8:** Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X σε ιζήματα KCZ. (α) Πρότυπη KCZ (για την παρασκευή των διαλυμάτων στο γαστρικό διαμέρισμα και ως περίσσεια στις μετρήσεις διαλυτότητας), (β) ίζημα στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα 7,5 min μετά την έναρξη κένωσης KCZ-H, (γ) ίζημα στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα 52,5 min μετά την έναρξη κένωσης KCZ-H, και (δ) ίζημα μετά από επώαση του διηθήματος του δείγματος που συλλέχθηκε από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα 7,5 min μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H.

## Γ.6 Πρόβλεψη της ενδοαυλικής καθίζησης της δραστικής ουσίας AZD0865

Στον Πίνακα Γ.4 παρουσιάζονται τα κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά την κένωση AZD-1 και AZD-2 από το γαστρικό διαμέρισμα. Η καθίζηση κατά την κένωση AZD-1 φαίνεται να είναι ουσιαστική κατά την πρώτη μισή ώρα (~15-20 %), ενώ η καθίζηση κατά την κένωση AZD-2 είναι περιορισμένη (μέχρι 8,1 % στους αρχικούς χρόνους). Πρέπει να τονιστεί ότι η κένωση AZD-2 μπορεί να λάμβανε χώρα μέσα στην πρώτη μισή ώρα μετά τη χορήγηση, επειδή ο συνολικός όγκος στο στόμαχο την στιγμή της χορήγησης ήταν περίπου 130 mL. Όγκοι περίπου 100 mL είναι δυνατόν να μην αδειάζουν ακολουθώντας πρωτοταξική κινητική κατά τη διαπεπτική περίοδο (Oberle et al. 1990), αλλά σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα Γ.4, εναλλακτικοί ρυθμοί κένωσης δε θα επηρέαζαν την καθίζηση στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου. Μετά από επώαση των διηθημάτων (48h/37°C), τα κλάσματα καθίζησης ποίκιλαν στην περίπτωση του AZD-1 από 0,95 (στο χρονικό διάστημα 0-15 min) μέχρι 0,72 (στο χρονικό διάστημα 60-75 min) και στην περίπτωση του AZD-2 από 0,93 (στο χρονικό διάστημα 0-15 min) ως 0,45 (στο χρονικό διάστημα 60-75 min). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν το στατιστικά σημαντικό υπερκορεσμό των περιεχομένων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα.

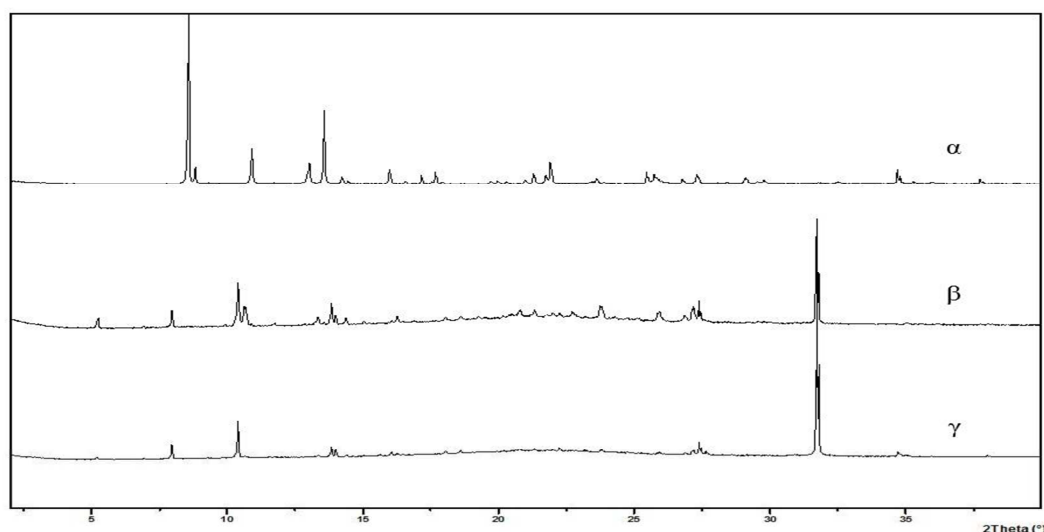
**Πίνακας Γ.4:** Μέσοι±τυπική απόκλιση για τα κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά την κένωση AZD-1 και AZD-2 από το γαστρικό διαμέρισμα (στην παρένθεση αναφέρονται οι συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας AZD στα AZD-1 και AZD-2).

<b>Χρονικό διάστημα (min)</b>	<b>AZD-1 (861 mg/mL)</b>	<b>AZD-2 (496 mg/mL)</b>
<b>0-15</b>	0,207±0,016*	0,081±0,034*
<b>15-30</b>	0,1520±0,0046*	0,053±0,052
<b>30-45</b>	0,031±0,014*	0,039±0,014*
<b>45-60</b>	0,090±0,118	0,026±0,027
<b>60-75</b>	0,0292±0,0054*	0,028±0,025

\* Στατιστικά υψηλότερο (p<0,05) από το μηδέν

Η μελέτη των φασμάτων περίθλασης ακτίνων X στη στερεή AZD, που καθίζησε στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά την κένωση AZD-1, υποδηλώνει την ταυτόχρονη παρουσία άμορφου υλικού και υλικού, το οποίο εμφανίζει κορυφές που αντιστοιχούν μερικώς στη δομή της στερεής σκόνης AZD, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων (Σχήμα Γ.9, α vs. β). Η μελέτη των φασμάτων περίθλασης ακτίνων X στη στερεή σκόνη AZD που συλλέχτηκε μετά την επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος υποδηλώνει την παρουσία στερεού AZD με δομή όμοια με αυτή της σκόνης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων (Σχήμα Γ.9, α vs. γ). Υλικό με δομή όμοια με αυτή της σκόνης αναφοράς παρατηρήθηκε περισσότερο στα δείγματα, τα οποία συλλέχτηκαν από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα τελικά στάδια της κένωσης από το γαστρικό διαμέρισμα. Όπως και στην περίπτωση των φασμάτων των στερεών KCZ, σε όλα σχεδόν τα φάσματα των στερεών AZD παρατηρήθηκαν επιπλέον κορυφές στις 5° και

32° 2θ, οι οποίες πιθανώς να οφείλονται σε οργανικό υλικό (π.χ. ένυδρη μορφή, άλας ή κρυσταλλική μορφή) και σε ανόργανα άλατα (π.χ. NaCl), αντίστοιχα.



**Σχήμα Γ.9:** Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X σε ιζήματα AZD. (α) Πρότυπη AZD (για την παρασκευή των διαλυμάτων στο γαστρικό διαμέρισμα και ως περίσσεια στις μετρήσεις διαλυτότητας), (β) ίζημα στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα 22,5 min μετά την έναρξη κένωσης AZD-1 και (γ) ίζημα μετά από επώαση (48h/37°C) του διηθήματος του δείγματος που συλλέχθηκε από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα 22,5 min μετά την έναρξη της κένωσης AZD-1.

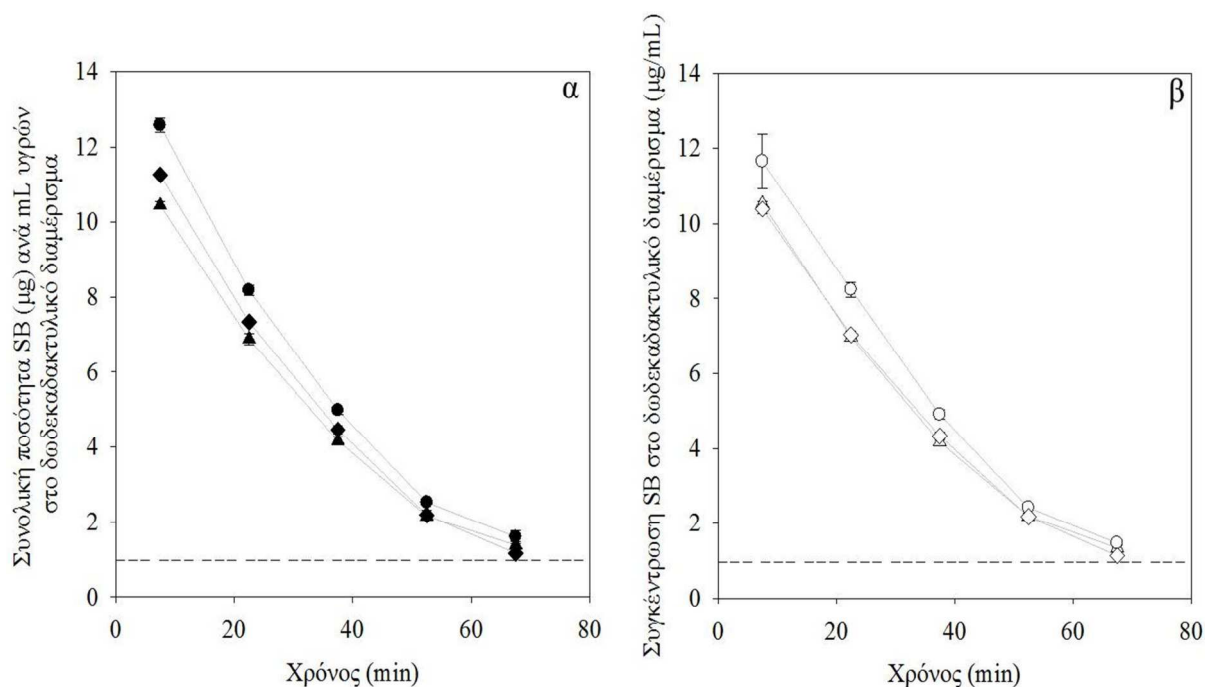
Δημοσιευμένα *in vivo* δεδομένα δείχνουν ότι για διάφορες Φ/Μ της AZD, συμπεριλαμβανομένων και των AZD-1 και AZD-2, τόσο η απεικόνιση  $AUC_t$  vs. Δόση, όσο και η  $C_{max}$  vs. Δόση είναι γραμμικές (Carlert et al. 2010). Συνεπώς, οι ρυθμοί απορρόφησης δεν επηρεάζονται από τη δόση, και η καθίζηση στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου (δηλ. ως μια διαδικασία, που καθυστερεί τη διαδικασία εισόδου στο αίμα) δε φαίνεται ότι συμβαίνει *in vivo* σε βαθμό τέτοιο, που να επηρεάζει τη διαδικασία εισόδου. Με βάση τα δεδομένα της KCZ (μιας βάσης υψηλής διαπερατότητας με παρόμοια κινητική απορρόφησης και απομάκρυνσης με αυτή της AZD), φαίνεται ότι μέχρι και 20 % καθίζηση στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου μετά από εφάπαξ χορήγηση δόσης 300 mg (παρούσα κλινική μελέτη) δεν επηρεάζει τη γραμμική σχέση τόσο  $AUC_t$  vs. Δόση, όσο και  $C_{max}$  vs. Δόση, ειδικά από τη στιγμή που αντίστοιχες γραμμικές απεικονίσεις έχουν αναφερθεί στη



βιβλιογραφία για δόσεις 200-800 mg (Huang et al. 1986). Τα *in vitro* δεδομένα με AZD-1 και AZD-2, επίσης, καταδεικνύουν μέχρι και 20 % καθίζηση στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου και ομοιότητες στις μορφές των ιζημάτων με τα αντίστοιχα της KCZ. Επομένως, θα μπορούσε να ισχυριστεί κάποιος ότι τα *in vitro* δεδομένα με AZD-1 και AZD-2 είναι σύμφωνα με τα *in vivo* φαρμακοκινητικά δεδομένα.

#### Γ.7 Πρόβλεψη της ενδοαυλικής καθίζησης της δραστικής ουσίας SB705498

Σύμφωνα με το Σχήμα Γ.10, η καθίζηση στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, αν υπάρχει, κατά την κένωση των SB Διαλύματος 1, SB Διαλύματος 2 και SB Διαλύματος 3 είναι ελάχιστη. Πράγματι, τα κλάσματα καθίζησης δεν ήταν σημαντικά κατά την κένωση του SB Διαλύματος 1, ήταν μέχρι 0,01 κατά την κένωση του SB Διαλύματος 2 και ήταν μέχρι 0,08 κατά την κένωση του SB Διαλύματος 3. Δεδομένου ότι και τα τρία διαλύματα είχαν παρόμοιες (κορεσμένες) συγκεντρώσεις (20,1-24,0 μg/mL), οι μικρές διαφορές στην καθίζηση μεταξύ των τριών διαλυμάτων μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές ποσότητες επιβραδυντή καθίζησης (HPMC) ή/και διαλυτοποιητή (PEG), που περιείχονταν στις χορηγηθείσες Φ/Μ (δεδομένα από προμηθευτή) και στα διαλύματα που τοποθετήθηκαν στο γαστρικό διαμέρισμα (Κεφ. Β.6.2). Μετά από επώαση (48h/37°C) των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος τα κλάσματα καθίζησης ποίκιλαν από 0,71 ως 0,87 για τα διηθήματα του SB Διαλύματος 1, από 0,72 ως 0,93 για τα διηθήματα του SB Διαλύματος 2 και από 0,71 ως 0,85 για τα διηθήματα του SB Διαλύματος 3, επιβεβαιώνοντας, ότι τα διηθήματα ήταν υπέρκορα σε παρόμοιο βαθμό. Λόγω της περιορισμένης διαθέσιμης ποσότητας των στερεών, που συλλέχτηκαν από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα και μετά από την επώαση (48h/37°C), δεν ήταν δυνατό να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα από φάσματα περίθλασης ακτίνων X.



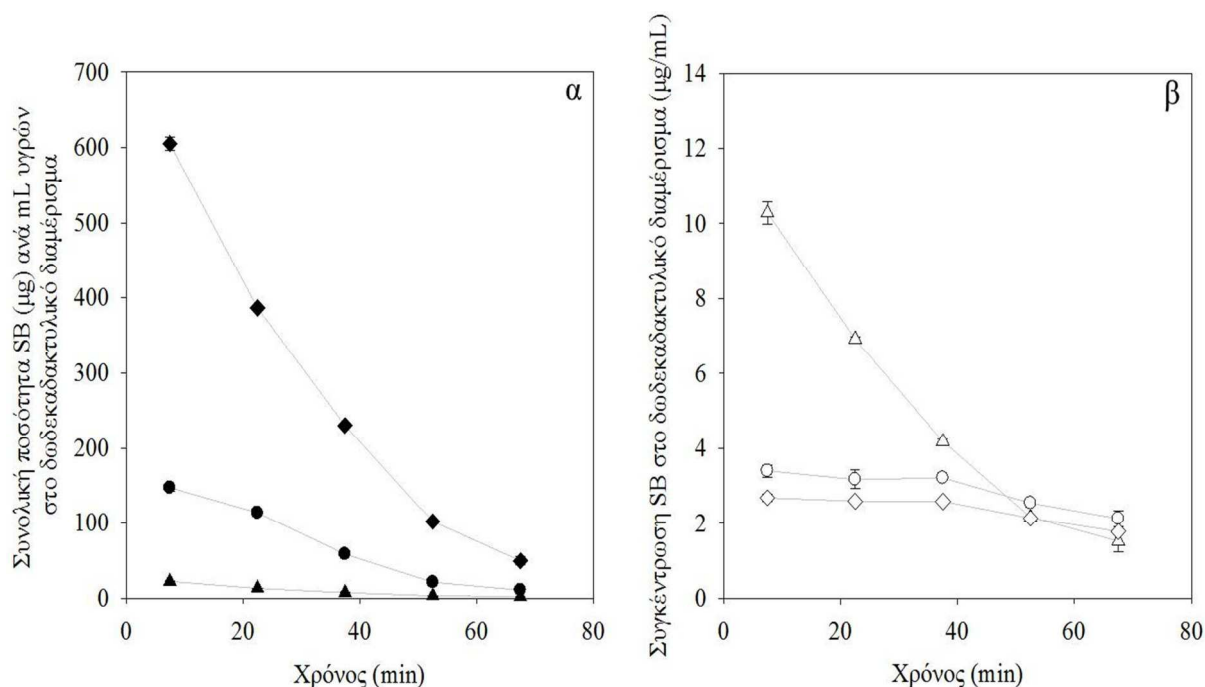
**Σχήμα Γ.10:** Μέσοι±Τυπική απόκλιση (α) για τη συνολική ποσότητα (στερεό λόγω καθίζησης και διαλυμένη) SB ανά mL και (β) τη συγκέντρωση SB στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα (n=3), μετά την έναρξη της κένωσης του SB Διαλύματος 1, δηλ. του διηθήματος του κορεσμένου SB Ελαιωρήματος 1 με συνολική δόση 10 mg (τρίγωνα), του SB Διαλύματος 2, δηλ. του διηθήματος του κορεσμένου SB Ελαιωρήματος 2 με συνολική δόση 100 mg (κύκλοι), και του SB Διαλύματος 3, δηλ. του διηθήματος του κορεσμένου SB Ελαιωρήματος 3 με συνολική δόση 400 mg (ρόμβοι). Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στη διαλυτότητα κορεσμού της SB στο FaSSIF-V2plus.

Οι συγκεντρώσεις στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά την κένωση του SB Ελαιωρήματος 1 ήταν ταυτόσημες με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις κατά την κένωση του SB Διαλύματος 1 (Σχήμα 11β vs. 10β, τρίγωνα), δηλ. δεν παρατηρήθηκε καθίζηση κατά την κένωση του SB Ελαιωρήματος 1. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά την κένωση του SB Ελαιωρήματος 2 κατά το πρώτο (0-15 min) και κατά το δεύτερο (15-30 min) χρονικό διάστημα ήταν 29 % και 38 % των συγκεντρώσεων, οι οποίες μετρήθηκαν κατά την κένωση του SB Διαλύματος 2 κατά τη διάρκεια των ίδιων χρονικών διαστημάτων. Από τη στιγμή, που πρακτικά δεν παρατηρήθηκε καθίζηση κατά την κένωση του SB Διαλύματος 2,

είναι λογικό να θεωρηθεί, ότι τα εκτιμώμενα κλάσματα καθίζησης *in vitro* μετά την έναρξη της κένωσης του SB Εναιωρήματος 2 είναι  $1-0,29=0,71$  κατά το χρονικό διάστημα 0-15 min και  $1-0,38=0,62$  κατά το χρονικό διάστημα 15-30 min. Παρόμοια, επειδή οι συγκεντρώσεις στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα κατά την κένωση του SB Εναιωρήματος 3 κατά τα δύο πρώτα χρονικά διαστήματα ήταν 26 % και 37 % των συγκεντρώσεων, οι οποίες μετρήθηκαν κατά την κένωση του SB Διαλύματος 3 κατά τη διάρκεια των ίδιων χρονικών διαστημάτων, και η καθίζηση κατά την κένωση του SB Διαλύματος 3 ήταν πρακτικά ανύπαρκτη, τα εκτιμώμενα κλάσματα καθίζησης *in vitro* μετά την έναρξη της κένωσης του SB Εναιωρήματος 3 είναι  $1-0,26=0,74$  και  $1-0,37=0,63$ , αντίστοιχα. Συνεπώς, τα *in vitro* δεδομένα δείχνουν ότι όταν η δραστική ουσία SB χορηγείται σε δόσεις 100 mg ή 400 mg, είναι πιθανό να υπάρξει σημαντική καθίζηση στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου, πολύ μεγαλύτερη από αυτή, που θα παρατηρηθεί μετά τη χορήγηση των τριών άλλων δραστικών ουσιών.

Τα κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος κατά την κένωση των SB Εναιωρήματος 1, SB Εναιωρήματος 2 και SB Εναιωρήματος 3 ήταν 0,69-0,86, 0,83-0,92 και 0,53-0,82, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας ότι τα διηθήματα ήταν υπέρκορα.

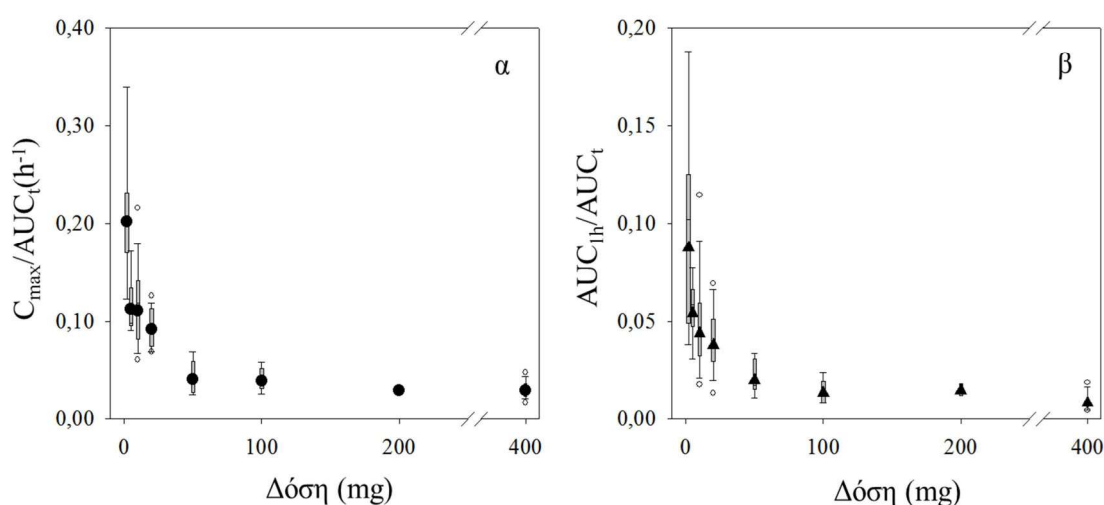
Η απεικόνιση  $AUC_t$  vs. Δόση παρουσιάζει μικρή απόκλιση από τη γραμμικότητα, ενώ σύμφωνα με την απεικόνιση  $C_{max}$  vs. Δόση η απόκλιση από τη γραμμικότητα είναι ξεκάθαρη για δόση μεγαλύτερη από 20 mg (δεδομένα από προμηθευτή). Συνεπώς, είναι δύσκολο να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με την πιθανότητα ο ρυθμός εισόδου της δραστικής ουσίας στη γενική κυκλοφορία να επηρεάζεται από τη δόση. Η παράμετρος  $C_{max}/AUC_t$  αντικατοπτρίζει μια σταθερά του συνολικού ρυθμού εισόδου στη γενική κυκλοφορία, χωρίς αυτή να επηρεάζεται από το κλάσμα της δόσης που απορροφάται (Endrenyi et al. 1991, Lacey et al. 1994). Εναλλακτικά, η παράμετρος  $AUC_{1h}/AUC_t$  αντικατοπτρίζει την αρχική έκθεση του οργανισμού σε SB, 1 h μετά τη χορήγηση, κανονικοποιημένη ως προς  $AUC_t$  (Chen, 1992, Macheras et al. 1994).



**Σχήμα Γ.11:** Μέσοι±Τυπική απόκλιση (α) για τη συνολική ποσότητα SB ανά mL και (β) τη συγκέντρωση SB στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα (n=3), μετά από την έναρξη της κένωσης του SB Ελαιωρήματος 1, δηλ. της προσομοίωσης της σύστασης των γαστρικών περιεχομένων μετά τη χορήγηση δισκίων SB συνολικής δόσης 10 mg, (τρίγωνα), του SB Ελαιωρήματος 2, δηλ. της προσομοίωσης της σύστασης των γαστρικών περιεχομένων μετά τη χορήγηση δισκίων SB συνολικής δόσης 100 mg, (κύκλοι), και του SB Ελαιωρήματος 3, δηλ. της προσομοίωσης της σύστασης των γαστρικών περιεχομένων μετά τη χορήγηση δισκίων SB συνολικής δόσης 400 mg, (ρόμβοι).

Σύμφωνα με το Σχήμα Γ.12, το  $C_{max}/AUC_t$ , αλλά και το  $AUC_{1h}/AUC_t$  μειώνονται, όσο αυξάνεται η δόση. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την ενδοαυλική διάλυση, την ικανότητα διαλυτοποίησης των ενδοαυλικών περιεχομένων ή/και στην καθίζηση στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου. Για δόσεις μέχρι 20 mg, οι τιμές των παραμέτρων  $C_{max}/AUC_t$  και  $AUC_{1h}/AUC_t$  μειώνονται σημαντικά, καθώς η δόση αυξάνεται. Αυτό, πιθανόν, να οφείλεται κυρίως σε αλλαγές στη διαδικασία διάλυσης, οι οποίες, τουλάχιστον κατά ένα ποσοστό μπορεί να σχετίζονται με τις διαφορετικές ποσότητες εκδόχων στις χορηγούμενες Φ/Μ. Για δόσεις μεγαλύτερες από 20 mg, οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου και ο αριθμός των αδιάλυτων σωματιδίων, που

φτάνουν στο λεπτό έντερο, αυξάνονται. Σε αυτήν την περίπτωση η καθίζηση αποτελεί τον πιθανότερο παράγοντα επίδρασης στον ρυθμό της απορρόφησης. Σε πολύ υψηλές δόσεις (100-400) mg, οι τιμές  $C_{max}/AUC_t$  και  $AUC_{1h}/AUC_t$  επηρεάζονται ελάχιστα από τη δόση. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι η καθίζηση σε αυτές τις περιπτώσεις είναι εκτετάμενη και ταχύτατη, οι συγκεντρώσεις της SB στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου είναι κοντά στα επίπεδα κορεσμού και οι ρυθμοί απορρόφησης είναι παρόμοιοι (απορρόφηση εξαρτώμενη από τη διαλυτότητα κορεσμού) για όσο διάστημα διατηρείται ο κορεσμός.



**Σχήμα Γ.12:** Θηκογράμματα και γεωμετρικοί μέσοι των  $C_{max}/AUC_t$  (α) και  $AUC_{1h}/AUC_t$  (β) σε συνάρτηση με τις SB δόσεις που χορηγήθηκαν σε υγιείς εθελοντές κατά τη διαπεπτική περίοδο. Κάθε θηκόγραμμα κατασκευάστηκε με τη χρήση 4-19 μεμονωμένων δεδομένων (αρχείο δεδομένων προμηθευτή).

Τα *in vivo* δεδομένα είναι σε συμφωνία με τα *in vitro* δεδομένα, καταδεικνύοντας πρακτικά ανύπαρκτη καθίζηση μετά τη χορήγηση δισκίων συνολικής δόσης 10 mg, αλλά στατιστικά σημαντική καθίζηση μετά τη χορήγηση δισκίων συνολικής δόσης 100 mg και 400 mg. Επίσης, τα *in vitro* δεδομένα προβλέπουν ότι οι ενδοαυλικές συγκεντρώσεις είναι πρακτικά παρόμοιες για δόσεις 100-400 mg (Σχήμα Γ.11 β), σε συμφωνία με τους πρακτικά παρόμοιους ρυθμούς απορρόφησης που παρατηρήθηκαν μετά τις εφάπαξ χορηγήσεις δόσεων αυτού του εύρους (Σχημά Γ.12). Τέλος, σε συμφωνία με παλιότερες δημοσιευμένες προσομοιώσεις (Sugano, 2010), τα *in vitro*

δεδομένα επιβεβαιώνουν τη σημασία της παρουσίας των μη διαλυμένων σωματιδίων στην καθίζηση (Σχήμα Γ.11β vs. Σχήμα Γ.10β).

## Δ. ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### Δ.1 Καθίζηση λιπόφιλων ασθενών βάσεων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο

Από την παρούσα κλινική μελέτη καταδεικνύεται ότι η καθίζηση δύο υψηλής διαπερατότητας λιπόφιλων ασθενών βάσεων (DPD και KCZ) στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο μετά από *per os* χορήγηση φαρμακολογικά σχετικών δόσεων είναι περιορισμένη. Πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι στην παρούσα κλινική μελέτη, για να διασφαλιστεί η διαφοροποίηση μεταξύ στερεών, που οφείλονται στην καθίζηση, και αδιάλυτων σωματίδιων, τα γαστρικά περιεχόμενα, τα οποία εισέχονταν στο λεπτό έντερο, περιείχαν τη δραστική ουσία σε διαλυμένη μορφή. Μετά από χορήγηση στερεής Φ/Μ μιας ασθενούς βάσης είναι δυνατό κάποια σωματίδια να μη διαλυθούν κατά την παραμονή τους στο στόμαχο, με αποτέλεσμα να δράσουν ως πυρήνες κρυστάλλωσης στο λεπτό έντερο και να οδηγήσουν σε καθίζηση. Σε τέτοια περίπτωση η καθίζηση θα ήταν μεγαλύτερη από αυτή που προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη. Από την άλλη, η μη πλήρης διάλυση της δόσης ενδογαστρικά, ίσως, οδηγήσει σε μειωμένη συγκέντρωση στο λεπτό έντερο και επομένως σε μικρότερη πιθανότητα καθίζησης.

Στην παρούσα μελέτη, καθίζηση παρατηρήθηκε σχεδόν σε όλα τα υπερκείμενα των δειγμάτων που αναρροφήθηκαν μετά από τις χορηγήσεις διαλυμάτων DPD και KCZ και επώαστηκαν (48h/37°C), καταδεικνύοντας ότι τα ενδοαυλικά περιεχόμενα ήταν υπέρκορα ως προς τη χορηγηθείσα φάση και η καθίζηση έλαβε χώρα με αργούς ρυθμούς.

Όμως, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στατιστικά σημαντική καθίζηση παρατηρήθηκε ακόμη και σε περιπτώσεις, όπου τα ενδοαυλικά περιεχόμενα ή/και τα υπερκείμενα αυτών μετά από επώαση ήταν ακόρεστα ως προς τη χορηγηθείσα φάση (Πίνακες Γ.2 και Γ.3). Για παράδειγμα, το δείγμα, το οποίο αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #3, 60 min μετά τη χορήγηση DPD-L είχε τα εξής χαρακτηριστικά:  $C_r=20,4$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $C=16,8$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $C_{inc}=11,7$   $\mu\text{g/mL}$  και  $C_s=378,5$   $\mu\text{g/mL}$  (pH των

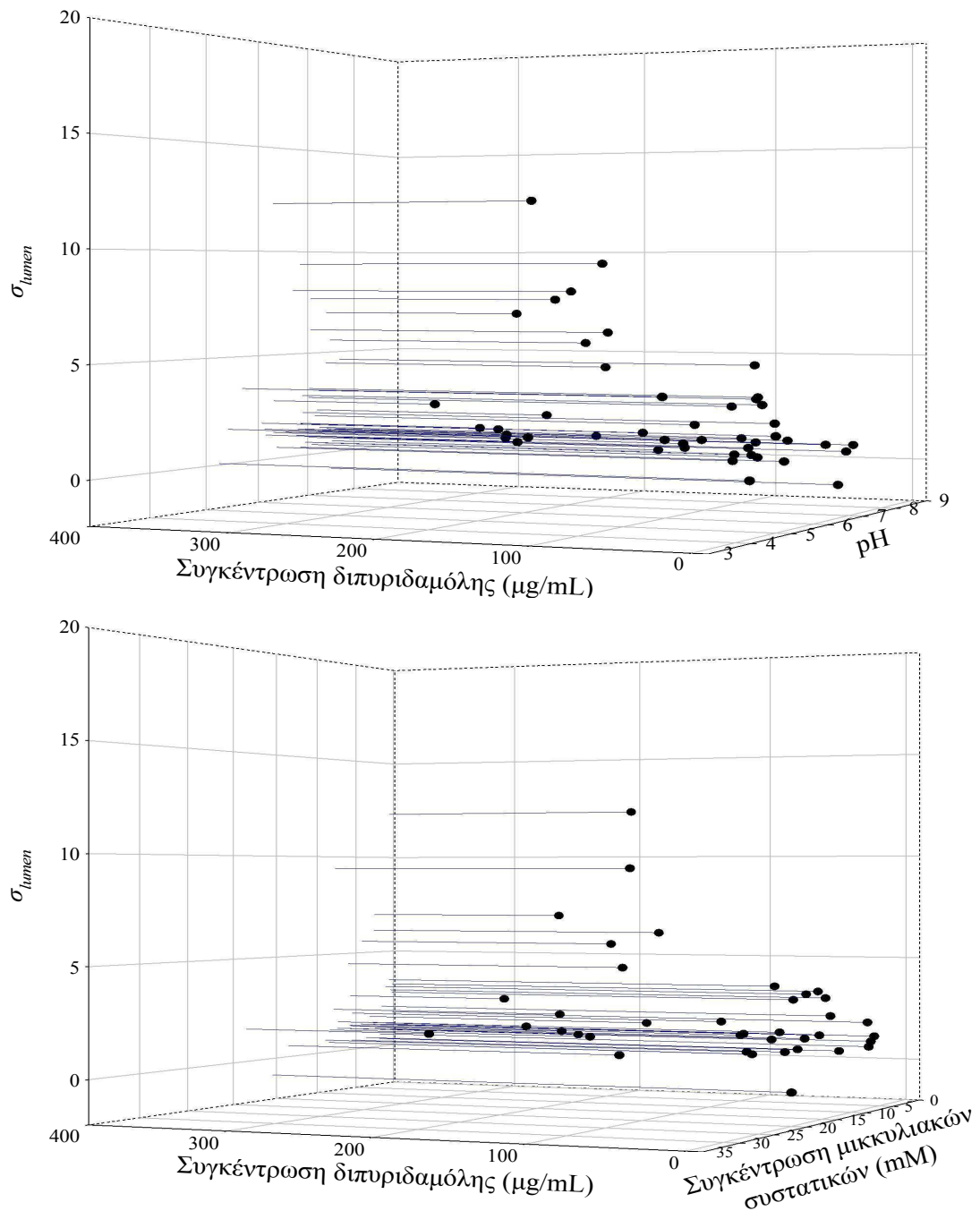
μέσων, στα οποία μετρήθηκαν αυτές οι συγκεντρώσεις ήταν 4,5-4,8). Δεδομένου ότι  $C_S$  είναι η διαλυτότητα κορεσμού της πιο σταθερής θερμοδυναμικά κρυσταλλικής φάσης, καθίζηση της δραστικής ουσίας στα ακόρεστα ως προς την ελεύθερη βάση ενδοαυτικά περιεχόμενα ή/και στα υπερκείμενα αυτών μετά από επώαση, θα μπορούσε να συμβεί στην περίπτωση που η φάση, η οποία καθίζησε ήταν διαφορετική από αυτή, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως περίσσεια στα πειράματα διαλυτότητας, δηλ. διαφορετική από την ελεύθερη βάση. Αυτό είναι δυνατό, αν για παράδειγμα, σχηματίστηκε μια ένυδρη μορφή, όπως στην περίπτωση του στερεού KCZ-H/5 min, το οποίο καθίζησε κατά την επώαση (48h/37°C) του υπερκείμενου δείγματος, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #1 (Σχήμα Γ.5γ). Οι ένυδρες μορφές έχουν, συνήθως, χαμηλότερη διαλυτότητα από τις αντίστοιχες άνυδρες μορφές (π.χ. Petrova et al. 2009), και η κρυσταλλική δομή των περισσότερων στερεών KCZ που καθίζησαν κατά την επώαση (48h/37°C) των υπερκείμενων των αναρροφηθέντων δειγμάτων ήταν αυτή, η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα Γ.5γ, και όχι αυτή του στερεού, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των χορηγηθέντων διαλυμάτων, που παρουσιάζεται στο Σχήμα Γ.5α. Εναλλακτικά, η φάση που έχει καθιζήσει μπορεί να είναι διαφορετική από την ελεύθερη βάση όταν το pH του αναρροφηθέντος δείγματος είναι όξινο, όπου μπορεί να λάβει χώρα καθίζηση άλατος ή/και αλάτων της βάσης. Έγιναν προσπάθειες να επιβεβαιωθεί η παρουσία στερεού άλατος ή/και αλάτων στα πολύ όξινα δείγματα, τα οποία αναρροφήθηκαν από το ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου υγιών εθελοντών κατά τη διαπεπτική περίοδο, με τη χρήση NMR, αλλά η μη διαθεσιμότητα του πρότυπου άλατος ή/και αλάτων, καθώς και η πολυπλοκότητα του αναρροφηθέντος δείγματος εμπόδισαν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Παρόλο, που δεν υπάρχουν αναφορές διαλυτότητας άλατος ή/και αλάτων KCZ, έχει αποδειχτεί ότι η διαλυτότητα της KCZ ποικίλει ανάλογα με την ταυτότητα του ανιόντος του ρυθμιστικού διαλύματος σε pH 3. Συγκεκριμένα, η διαλυτότητα της KCZ στους 23 °C σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, κιτρικών, D-τρυγικών, L-τρυγικών, και D, L-τρυγικών με pH 3 προσδιορίστηκε από 2,07 mg/mL (φωσφορικά) ως 8,5 mg/mL (L-τρυγικών) (Buchanan et al. 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολύ όξινες τιμές pH, η δημιουργία δυσδιάλυτων αλάτων KCZ με διαφορετική διαλυτότητα ανάλογα με το ανιόν, μπορεί να οδηγήσει σε καθίζηση ενδοαυτικά. Έτσι, πιθανόν, να εξηγείται ότι



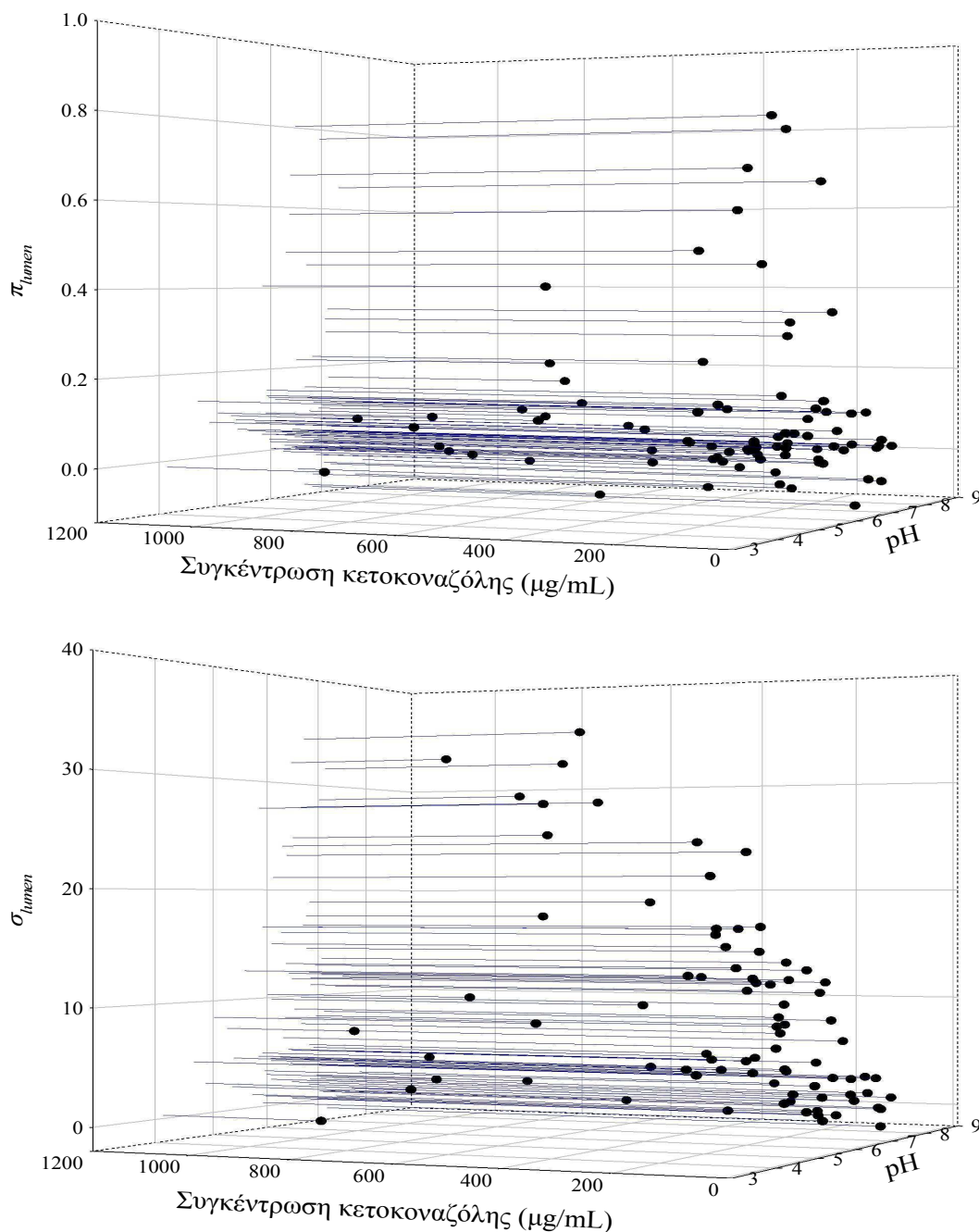
σε επτά αναρροφηθέντα δείγματα με συγκέντρωση KCZ 67,2-932,5 μg/mL και  $2,5 < \text{pH} < 4,4$  παρατηρήθηκε σημαντική καθίζηση ( $\pi_{\text{lumen}} > 0,1$ ).

Με δεδομένα τα προβλήματα, τα οποία σχετίζονται με την αξιοπιστία των μετρήσεων διαλυτότητας της ελεύθερης βάσης σε πολύ όξινα δείγματα [εξαιτίας της μεταβολής του pH στην ισορροπία ή/και το σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων] και της πιθανότητας καθίζησης διαφορετικής φάσης ακόμη και σε τιμές pH κοντά στο ουδέτερο, πρέπει το φαινόμενο της καθίζησης σε σχέση με τον υπερκορεσμό να προσεγγίζεται με προσοχή. Ο υπερκορεσμός θα πρέπει να αναφέρεται σε συγκεκριμένη φάση και η διαλυτότητα κορεσμού θα πρέπει να προσδιορίζεται, όταν τα χαρακτηριστικά του μέσου παραμένουν αναλλοίωτα.

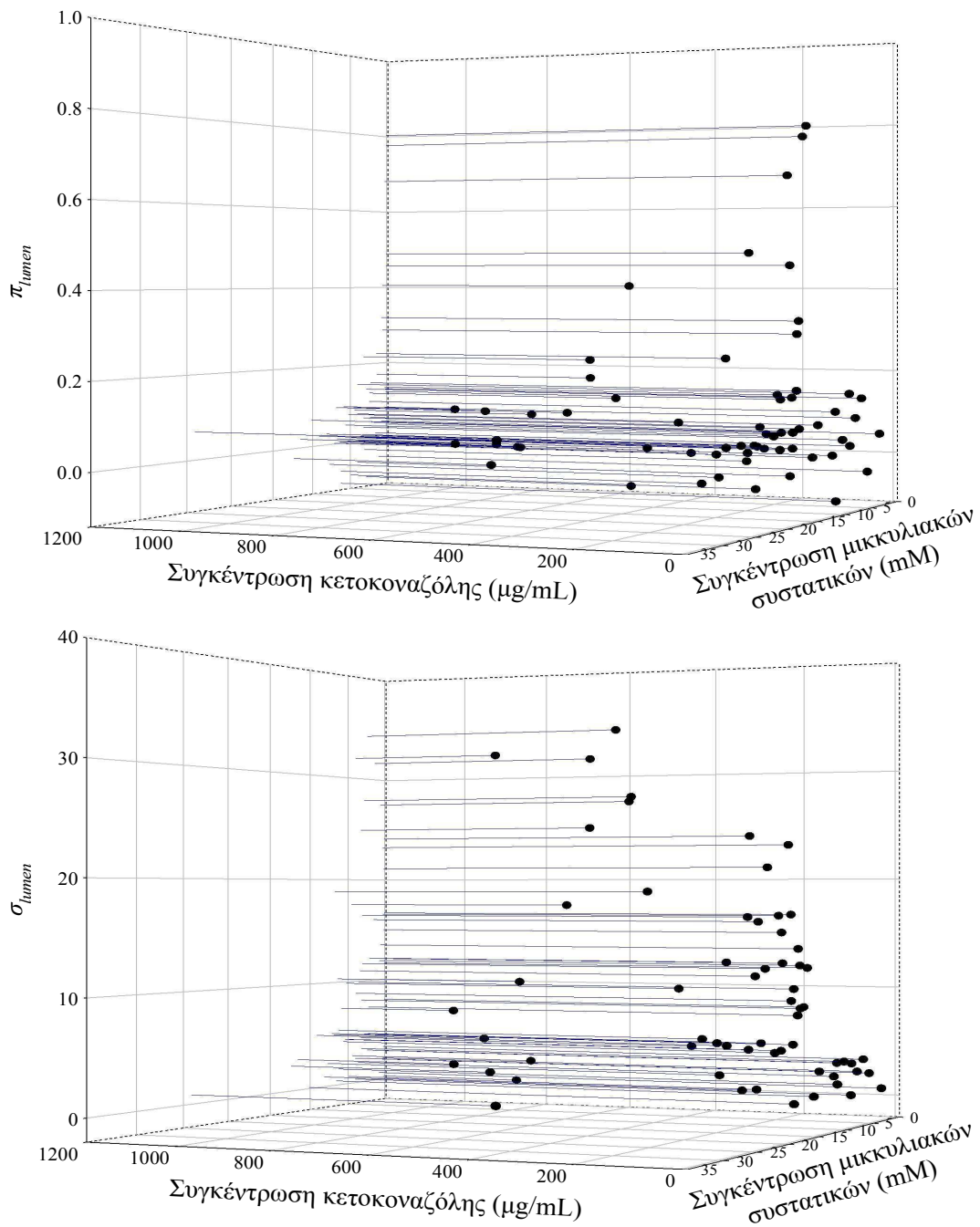
Τα Σχήματα Δ.1-Δ.3 περιέχουν δεδομένα από όλα τα διαθέσιμα δείγματα, τα οποία αναρροφήθηκαν και δεν ήταν εξαιρετικά όξινα (δηλ. είχαν  $\text{pH} > 3,6$ ) και, εάν παρατηρήθηκε σε αυτά καθίζηση, η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο αναρροφηθέν δείγμα δεν ήταν μικρότερη από τη διαλυτότητα της βάσης στο συγκεκριμένο δείγμα. Εξαιτίας των λίγων πληροφοριών, αποφασίστηκε να συμπεριληφθούν τα δεδομένα από τα αναρροφηθέντα δείγματα, στα οποία το στερεό, το οποίο καθίζησε σε αυτά, είχε διαφορετική κρυσταλλική δομή από αυτό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διαλυτότητας. Πρέπει να επισημανθεί, ότι η διαλυτότητα κορεσμού στα δείγματα με στερεό, που καθίζησε, με διαφορετική κρυσταλλική δομή από τη χορηγηθείσα βάση μπορεί να διαφέρει ελάχιστα από τη μετρούμενη διαλυτότητα κορεσμού της χορηγηθείσας βάσης. Εάν η διαφορετική κρυσταλλική δομή αντιστοιχούσε σε μια ένυδρη μορφή, θα έπρεπε να έχει μικρότερη διαλυτότητα κορεσμού από την αντίστοιχη άνυδρη μορφή και, συνεπώς, οι δείκτες υπερκορεσμού, που παρουσιάζονται στα Σχήματα Δ.1-Δ.3 μπορεί να είναι ελάχιστα υποεκτιμημένοι.



**Σχήμα Δ.1:** Ο δείκτης υπερκορεσμού της DPD,  $\sigma_{lumen}$ , ως συνάρτηση της ενδοαυλικής συγκέντρωσης DPD και του pH (n=46 αναρροφηθέντα δείγματα, άνω γράφημα) και ως συνάρτηση της ενδοαυλικής συγκέντρωσης DPD και της συνολικής συγκέντρωσης των μικκυλιακών συστατικών [n=38 αναρροφηθέντα δείγματα, κάτω γράφημα). Τα αναρροφηθέντα δείγματα με  $\text{pH} \leq 3,6$  και τα δείγματα εκείνα, στα οποία παρατηρήθηκε καθίζηση, αλλά τα αντίστοιχα υπερκείμενα δεν ήταν κορεσμένα με τη βάση, δεν συμπεριλήφθηκαν.



**Σχήμα Δ.2:** Το κλάσμα καθίζησης της KCZ,  $\pi_{lumen}$ , (άνω γράφημα) και ο δείκτης υπερκορεσμού της KCZ βάσης,  $\sigma_{lumen}$ , (κάτω γράφημα) ως συνάρτηση της ενδοαυλικής συγκέντρωσης KCZ και του pH. Και τα δύο γραφήματα περιέχουν δεδομένα από τον ίδιο αριθμό μεμονωμένων αναρροφηθέντων δειγμάτων ( $n=83$ ). Τα αναρροφηθέντα δείγματα με  $\text{pH} \leq 3,6$  και τα δείγματα εκείνα, στα οποία παρατηρήθηκε καθίζηση, αλλά τα αντίστοιχα υπερκείμενα δεν ήταν κορεσμένα με τη βάση, δεν συμπεριλήφθηκαν.



**Σχήμα Δ.3:** Το κλάσμα καθίζησης της KCZ,  $\pi_{lumen}$ , (άνω γράφημα) και ο δείκτης υπερκορεσμού της KCZ βάσης,  $\sigma_{lumen}$ , (κάτω γράφημα) ως συνάρτηση της ενδοαυλικής συγκέντρωσης KCZ και της συνολικής συγκέντρωσης των μικκυλιακών συστατικών. Και τα δύο γραφήματα περιέχουν δεδομένα από τον ίδιο αριθμό μεμονωμένων αναρροφηθέντων δειγμάτων ( $n=62$ ). Τα αναρροφηθέντα δείγματα με  $pH \leq 3,6$  και τα δείγματα εκείνα, στα οποία παρατηρήθηκε καθίζηση, αλλά τα αντίστοιχα υπερκείμενα δεν ήταν κορεσμένα με τη βάση, δεν συμπεριλήφθηκαν.

Εξαιτίας της ελάχιστης καθίζησης, η σχέση της καθίζησης της DPD με το pH ή/και με τη συνολική συγκέντρωση των μικκυλιακών συστατικών δεν ήταν δυνατό να ερευνηθεί σε βάθος. Παρόλα αυτά, για ενδοαυλικές συγκεντρώσεις DPD 19,4-275,6  $\mu\text{g/mL}$ , τα περιεχόμενα του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου ήταν υπέρκορα ως προς τη βάση, όταν είχαν pH μεγαλύτερο από περίπου 5 και η συνολική συγκέντρωση των μικκυλιακών συστατικών τους ήταν μικρότερη από περίπου 10 mM (Σχήμα Δ.1).

Σύμφωνα με το Σχήμα Δ.2, για ενδοαυλικές συγκεντρώσεις KCZ από 19,6 ως 924.8  $\mu\text{g/mL}$ , η βάση καθιζάνει, όταν το pH των περιεχομένων του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου είναι μεγαλύτερο από περίπου 5, ενώ, ταυτόχρονα, σε παρόμοιο pH τα περιεχόμενα του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου είναι υπέρκορα ως προς τη βάση.

Με βάση το Σχήμα Δ.3, για ενδοαυλικές συγκεντρώσεις KCZ από 19,6 ως 924.8  $\mu\text{g/mL}$ , η βάση καθιζάνει, όταν η συνολική συγκέντρωση των μικκυλιακών συστατικών των περιεχομένων του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου είναι μικρότερη από περίπου 5 mM, ενώ, τα περιεχόμενα του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου είναι υπέρκορα ως προς τη βάση, όταν η συνολική συγκέντρωση των μικκυλιακών συστατικών τους είναι μικρότερη από περίπου 10 mM. Συνεπώς, για συνολική συγκέντρωση μικκυλιακών συστατικών των περιεχομένων του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου μεταξύ 5 και 10 mM φαίνεται, ότι αυτά μπορεί να είναι υπέρκορα ως προς τη βάση, χωρίς, όμως, να λαμβάνει χώρα στατιστικά σημαντική καθίζηση.

Ανακεφαλαιώνοντας, στις ενδοαυλικές συγκεντρώσεις, που παρατηρήθηκαν μετά τη χορήγηση φαρμακολογικά σχετικών δόσεων DPD ή KCZ, συνήθως τα ενδοαυτικά περιεχόμενα έχουν  $\text{pH} > 5$ , συγκέντρωση μικκυλιακών συστατικών  $< 5$  mM και είναι υπέρκορα ως προς τη βάση.

Τελειώνοντας το σχολιασμό των δεδομένων της κλινικής μελέτης είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι με βάση δεδομένα διαλυτότητας DPD σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών (pH 7,0), ο λόγος δόση προς διαλυτότητα της DPD για τις δόσεις DPD-L (30 mg) και DPD-H (90 mg), που χορηγήθηκαν στους υγιείς εθελοντές, είναι 9 L και 27 L, αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας δεδομένα διαλυτότητας

KCZ σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών (pH 7,0), ο λόγος δόση προς διαλυτότητα της KCZ για τις δόσεις KCZ-L (100 mg) και KCZ-H (300 mg), που χορηγήθηκαν στους υγιείς εθελοντές, είναι 55 L και 164 L, αντίστοιχα. Συνεπώς, μπορεί να ισχυριστεί κάποιος ότι, αν η δόση μιας υψηλής διαπερατότητας βάσης διαλυθεί (σχεδόν) κατά την παραμονή της στο στομάχο και ο λόγος δόση προς διαλυτότητα της μη ιονισμένης μορφής της είναι μέχρι 50 L, πρέπει να αναμένεται εξαιρετικά περιορισμένη ενδοαυλική καθίζηση. Στατιστικά σημαντική καθίζηση πρέπει να αναμένεται, όταν ο λόγος δόση προς διαλυτότητας της μη ιονισμένης μορφής της είναι περίπου 160 L ή μεγαλύτερος. Αυτά τα ευρήματα φαίνεται να είναι σε συμφωνία με μια πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία, η οποία προέβλεψε ενδοαυλική καθίζηση της νελφίναβιρης ( $pK_a$  συζυγούς οξέος 6,0) κατά τη διαπεπτική περίοδο, ικανή να επηρεάσει την απορρόφησή της, όταν ο λόγος Δόση/Διαλυτότητα σε pH 7 ήταν 417 L (Shono et al. 2011).

## Δ.2 Πρόβλεψη της καθίζησης λιπόφιλων βάσεων με *in vitro* διατάξεις

Η ανάπτυξη αξιόπιστων *in vitro* μεθοδολογιών για την εκτίμηση της έκτασης την ενδοαυλικής καθίζησης των δυσδιάλυτων, υψηλής διαπερατότητας λιπόφιλων ασθενών βάσεων μετά από *per os* χορήγηση θα διευκόλυνε την ανάπτυξή τους, διότι θα οδηγούσε στη θεώρηση κατάλληλων τροποποιήσεων με στόχο τη μείωση του φαινομένου της ενδοαυλικής καθίζησης. Η μείωση της καθίζησης θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αρχικής και, πιθανώς, της μέγιστης έκθεσης του οργανισμού στο φάρμακο, ενώ θα μειωνόταν και η μεταβλητότητά της διαδικασίας της απορρόφησης.

Η μέχρι τώρα εμπειρία με τις *in vitro* διατάξεις (Carlert et al. 2010) μαζί με τα ενδοαυτικά δεδομένα τη παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι η προσομοίωση των διαρκώς μειούμενων συγκεντρώσεων ενδοαυτικά σε συνδυασμό με τις *in vitro* υδροδυναμικές συνθήκες αποτελούν τους βασικούς παράγοντες για αξιόπιστη εκτίμηση των ενδοαυλικών συγκεντρώσεων και της πιθανής καθίζησης των λιπόφιλων ασθενών βάσεων στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου. Πράγματι, ένα βασικό χαρακτηριστικό της προτεινόμενης στην παρούσα διατριβή *in vitro*

μεθοδολογίας σε σχέση με προηγούμενες, ήδη δημοσιευμένες, *in vitro* διατάξεις είναι ότι η μετά τη χορήγηση διαρκώς μειούμενη με την πάροδο του χρόνου συγκέντρωση στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου προσομοιώνεται επαρκώς. Αυτές οι παράμετροι μπορεί να χρειάζεται να προσαρμοστούν στην περίπτωση των χαμηλής διαπερατότητας μορίων. Επίσης, η βελτιστοποίηση των υδροδυναμικών συνθηκών στο γαστρικό διαμέρισμα είναι απαραίτητη για μόρια, τα οποία διαλύονται μερικώς στο στόμαχο. Η σύσταση των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος φαίνεται ότι είναι εξίσου σημαντική, διότι παρόλο το γεγονός ότι το FaSSIF-V2 είναι καλύτερο από το FaSSIF στην εκτίμηση της ενδοαυλικής διάλυσης (Sugano, 2010), το FaSSIF-V2 δεν είναι τόσο κατάλληλο όσο το FaSSIF-V2plus στην εκτίμηση της ενδοαυλικής καθίζησης της KCZ.

Η *in vitro* μεθοδολογία που αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αποδείχτηκε επαρκής για την αναπαραγωγή τόσο των ενδοαυλικών συγκεντρώσεων όσο και των κλασμάτων καθίζησης των KCZ και DPD μετά από *per os* χορήγηση των διαλυμάτων τους κατά τη διαπεπτική περίοδο και σε δύο διαφορετικές δόσεις. Επιπρόσθετα, η μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την αξιολόγηση δύο άλλων λιπόφιλων ασθενών βάσεων, AZD0856 και SB705498, χρησιμοποιώντας προηγουμένως συλλεχθέντα δεδομένα σε πλάσμα ανθρώπων.

## E. Βιβλιογραφία

### E.1 Ελληνική βιβλιογραφία

Βερτζώνη Μαρία, Διδακτορική Διατριβή, Βελτιστοποίηση της προσομοίωσης της διάλυσης λιπόφιλων μορίων στον ανώτερο γαστρεντερικό αυλό για την πρόβλεψη της απορρόφησης, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2004.

Εθνικό Συνταγολόγιο, Διπυριδαμόλη, σελ. 138, Κετοκοναζόλη, σελ. 330, ISBN 978-960-86876-8-4, Ελληνικός Οργανισμός Φαρμάκων 2007, Αθήνα, Ελλάδα.

### E.2 Αγγλική βιβλιογραφία

Abrahamsson B, Albery T, Eriksson A, Gustafsson I, Sjöberg M. Food effects on tablet disintegration. *Eur J Pharm Sci.* 2004;**22**(2-3):165-172.

Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;**59**(7):546-567.

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;**12**(3):413-420.



Appel L, Babcock W, Friesen DT, Ray RJ, Shamblin S, Shanker R, Smithey D. Pharmaceutical dosage forms comprising a low-solubility drug and a polymer. Patent WO 2006/024944 A2, 2006.

Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, Peyrot J, Salducci J, Lairon D. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am J Physiol.* 1996;**271**(1 Pt 1):G172-G183.

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.

Avdeef A. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;**59**(7):568-590.

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.

Avdeef A, Tsinman O. Miniaturized rotating disk intrinsic dissolution rate measurement: effects of buffer capacity incomparisons to traditional Wood's apparatus. *Pharm Res.* 2008;**25**(11):2613-2627.

Bateman N, Gellert PR, De Matas M, Potts AM, Patent Application Publication, Pub. No. WO/2005/011647, USA, 2005.

Berger CM, Tsinman O, Voloboy D, Lipp D, Stones S, Avdeef A. Technical note: miniaturized intrinsic dissolution rate (Mini-IDR (TM)) measurement of griseofulvin and carbamazepine. *Dissolution Technol.* 2007;**14**(4):39-41.

Bevernage J, Brouwers J, Clarysse S, Vertzoni M, Tack J, Annaert P, Augustijns P. Drug supersaturation in simulated and human intestinal fluids representing different nutritional states, *J Pharm Sci.* 2010;**99**(11):4525-4534.

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,<sup>TM</sup> simulations to predict absorption. *J Pharm Sci.* 2011;**100**(11):4756-4765.

Blagden N, de Matas M, Gavan PT, York P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;**59**(7):617-630.

Bogardus JB, Blackwood RK. Solubility of doxycycline in aqueous solution. *J Pharm Sci.* 1979;**68**(2):188-194.

Box K, Comer J. Using measured  $pK_a$ ,  $\log P$  and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class. *Curr Drug Metab.* 2008;**9**(9):869-878.

Box K, Comer J, Gravestock T, Stuart M. New ideas about the solubility of drugs. *Chem Biodivers.* 2009;**6**(11):1767-1788.

Box K, Völgyi G, Baka E, Stuart M, Takács-Novák K, Comer J. Equilibrium versus kinetic measurements of aqueous solubility, and the ability of compounds to supersaturate in solution-a validation study. *J Pharm Sci.* 2006;**95**(6):1298-1307.

Brewster M, Mackie C, Lampo A, Noppe M, Loftsson T. 2007. The use of solubilizing excipients and approaches to generate toxicology vehicles for contemporary drug pipelines. in: Solvent systems and their selection in pharmaceuticals and biopharmaceuticals (Augustijns P, Brewster ME, eds.), AAPS Press and Springer, New York, pp 221-256, 2007.

Brouwers J, Brewster M, Augustijns P. Supersaturating drug delivery systems: the answer to solubility-limited oral bioavailability? *J Pharm Sci.* 2009;**98**(8):2549-2572.

Brouwers J, Tack J, Augustijns P. *In vitro* behavior of a phosphate ester prodrug of amprenavir in human intestinal fluids and in the Caco-2 system: Illustration of intraluminal supersaturation. *Int J Pharm.* 2007;**336**(2):302-309.

Brouwers J, Tack J, Lammert F, Augustijns P. Intraluminal drug and formulation behavior and integration in *in vitro* permeability estimation: A case study with Amprenavir. *J Pharm Sci.* 2006;**95**(2):372-383.

Buchanan CM, Buchanan NL, Edgar KJ, Ramsey MG. Solubility and dissolution studies of antifungal drug: hydroxybutenyl- $\beta$ -cyclodextrin complexes. *Cellulose.* 2007;**14**(1):35-47.

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.

Carlert S, Pålsson A, Hanisch G, von Corswant C, Nilsson C, Lindfors L, Lennernäs H, Abrahamsson B. Predicting intestinal precipitation-a case example for a basic BCS class II drug. *Pharm Res.* 2010;**27**(10):2119-2130.

Chen M-L. An alternative approach for assessment of rate of absorption in bioequivalence studies. *Pharm Res.* 1992;**9**(11):1380-1385.

Chen P, Bis J, Igo D. Science and Technology Showcase: Application of Raman Spectroscopy to solid form screening. Newsletter AAPS Preformulation Focus Group March 2012, Issue 6.

Chen TM, Shen H, Zhu C. Evaluation of a method for high throughput solubility determination using a multi-wavelength UV plate reader. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2002;**5**(7):575-581.

Clarysse S, Psachoulias D, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Duchateau G, Reppas C, Augustijns P. Postprandial changes in solubilizing capacity of human intestinal fluids for BCS class II drugs. *Pharm Res.* 2009;**26**(6):1456-1466.

Clarysse S, Tack J, Lammert F, Duchateau G, Reppas C, Augustijns P. Postprandial evolution in composition and characteristics of human duodenal fluids in different nutritional states. *J Pharm Sci.* 2009a;**98**(3):1177-1192.

Deshwal BR, Lee HK, Singh KC. Excess volumes of mixing of 1:1 electrolyte solutions at 308.15 K in aqua-DMF mixed solvent system. *J Mol Liq.* 2006;**123**(1):38-42.

Diakidou A, Vertzoni M, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Simulation of gastric lipolysis and prediction of felodipine release from a matrix tablet in the fed stomach. *Eur J Pharm Sci.* 2009a;**37**(2):133-140.

Diakidou A, Vertzoni M, Goumas K, Söderlind E, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the contents of ascending colon to which drugs are exposed after oral administration to healthy adults. *Pharm Res.* 2009b;**26**(9):2141-2151.

Endrenyi L, Fritsch S, Yan W. C<sub>max</sub>/AUC is a clearer measure than C<sub>max</sub> for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1991;**29**(10):394-399.

Galia E, Horton J, Dressman JB. Albendazole Generics-A Comparative In Vitro Study. *Pharm Res.* 1999;**16**(12):1871-1875.

Galia E, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB. 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, Akrami A, Alvarez F, Hu J, Li L, Ma C, Surapaneni S. Characterization and optimization of AMG 517 supersaturatable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS) for improved oral absorption. *J Pharm Sci.* 2009;**98**(2):516-528.

Gao P, Guyton ME, Huang T, Bauer JM, Stefanski KJ, Lu Q. Enhanced oral bioavailability of a poorly water soluble drug PNU-91325 by supersaturatable formulations. *Drug Dev Ind Pharm.* 2004;**30**(2):221-229.

Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang T, Bauer JM, Morozowich W, Kuo M, Hageman MJ. Development of a supersaturable SEDDS (SSEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci.* 2003;**92**(12):2386-2398.

Gellert PR, De Matas M, Parker MD, Patent Application Publication, Pub. No. US 2005/0163835, USA, 2005.

Gu CH, Rao D, Gandhi RB, Hilden J, Raghavan K. Using a novel multicompartement 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.

Guidance for Industry, Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, FDA, Washington, D.C., USA, August 2000.

Gribbon P, Sewing A. High-throughput drug discovery: what can we expect from HTS? *Drug Discov Today.* 2005;**10**(1):17-22.

Guzmán H, Tawa M, Zhang Z, Ratanabanangkoon P, Shaw P, Gardner C, Chen H, Moreau J, Almarsson O, Remenar J. 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, Parks M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm Res.* 2000;**17**(4):397-404.

Heimbach T, Oh D, Li LY, Forsberg M, Savolainen J, Leppänen J, Matsunaga Y, Flynn G, Fleisher D. Absorption rate limit considerations for oral phosphate prodrugs. *Pharm Res.* 2003a;**20**(6):848-856.

Heimbach T, Oh D, Li LY, Rodríguez-Hornedo N, Garcia G, Fleisher D. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int J Pharm.* 2003b;**261**(1-2):81-92.

Hernell O, Staggers JE, Carey MC. Physical-Chemical behaviour of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry.* 1990;**29**(8):2041-2056.

Higuchi WI, Bernardo PD, Mehta SC. Polymorphism and drug availability.II. Dissolution rate behavior of the polymorphic forms of sulfathiazole and methylprednisolone. *J Pharm Sci.* 1967;**56**(2):200-207.

Higuchi T, Shih FM, Kimura T, Rytting JH. Solubility determination of barely aqueous-soluble organic solids. *J Pharm Sci.* 1979;**68**(10):1267-1272.

Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;**46**(1-3):75-87.

Huang YC, Colaizzi JL, Bierman RH, Woestenborghs R, Heykants J. Pharmacokinetics and dose proportionality of ketoconazole in normal volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;**30**(2):206-210.

Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res.* 2008;**25**(7):1663-1676.

Juenemann D, Bohets H, Ozdemir M, de Maesschalck R, Vanhoutte K, Peeters K, Nagels L, Dressman JB. Online monitoring of dissolution tests using dedicated potentiometric sensors in biorelevant media. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;**78**(1):158-165.

Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res.* 2006a;**23**(1):165-176.

Kalantzi L, Persson E, Polentarutti B, Abrahamsson B, Goumas K, Dressman JB, Reppas C. Canine intestinal contents vs. simulated media for the assessment of solubility of two weak bases in the human small intestinal contents. *Pharm Res.* 2006b;**23**(6):1373-1381.

Kaukonen AM, Laitinen L, Salonen J, Tuura J, Heikkilä T, Linnell T, Hirvonen J, Lehto V. Enhanced in vitro permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;**66**(3):348-356.



Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;**62**(1):3-16.

Kelly K, O'Mahony B, Lindsay B, Jones T, Grattan TJ, Rostami-Hodjegan A, Stevens HN, Wilson CG. Comparison of the rates of disintegration, gastric emptying, and drug absorption following administration of a new and a conventional paracetamol formulation, using gamma scintigraphy. *Pharm Res.* 2003;**20**(10):1668-1673.

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.

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.

Kramer SF, Flynn GL. Solubility of organic hydrochlorides. *J Pharm Sci.* 1972;**61**(12):1896-1904.

Lacey LF, Keene ON, Duquesnoy C, Bye A. Evaluation of different indirect measures of rate of drug absorption in comparative pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci.* 1994;**83**(2):212-215.

Leontidis E. Hofmeister anion effects on surfactant self-assembly and the formation of porous solids. *Curr Opin Colloid Int Sci.* 2002;**7**(1, 2):81-91.

Leuner C, Dressman JB. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;**50**(1):47-60.

Li S, Doyle P, Metz S, Royce AE, Serajuddin ATM. Effect of chloride ion on dissolution of different salt forms of haloperidol, a model basic drug. *J Pharm Sci.* 2005;**94**(10):2224-2231.

Lim SG, Sawyerr AM, Hudson M, Sercombe J, Pounder RE. Short report: The absorption of fluconazole and itraconazole under conditions of low intragastric acidity. *Aliment Pharmacol Ther.* 1993;**7**(3):317-321.

Lindahl A, Ungell AL, Knutson L, Lennernäs H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharm Res.* 1997;**14**(4):497-502.

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.

Liu XY. A new kinetic model for three-dimensional heterogeneous nucleation. *J Chem Phys.* 1999;**111**(4):1628-1635.

Macheras P, Symillides M, Reppas C. The cutoff time point of the partial area method for assessment of rate of absorption in bioequivalence studies. *Pharm Res.* 1994;**11**(6):831-834.

Martin A, Wu PL, Adjei A, Lindstrom RE, Elworthy PH. Extended hildebrand solubility approach and the *log* linear solubility equation. *J Pharm Sci* 1982;**71**(8):849-856.

Matteucci ME, Brettmann BK, Rogers TL, Elder EJ, Peters JI, Williams R III, Johnston KP. Design of potent amorphous drug nanoparticles for rapid generation of highly supersaturated media. *Mol Pharm*. 2007;**4**(5):782-793.

Mellaerts R, Mols R, Kayaert P, Annaert P, Van Humbeeck J, Van den Mooter G, Martens JA, Augustijns P. Ordered mesoporous silica induces pH-independent supersaturation of the basic low solubility compound itraconazole resulting in enhanced transepithelial transport. *Int J Pharm*. 2008;**357**(1-2):169-179.

Miller DA, DiNunzio JC, Yang W, McGinity JW, Williams R III. Enhanced *in vivo* absorption of itraconazole via stabilization of supersaturation following acidic-to-neutral pH transition. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008a;**34**(8):890-902.

Miller DA, DiNunzio JC, Yang W, McGinity JW, Williams R III. Targeted intestinal delivery of supersaturated itraconazole for improved oral absorption. *Pharm Res*. 2008b;**25**(6):1450-1459.

Miller DA, McConville JT, Yang W, Williams R III, McGinity JW. Hot-melt extrusion for enhanced delivery of drug particles. *J Pharm Sci*. 2007;**96**(2):361-376.

Mosharraf M, Sebhatu T, Nyström C. The effects of disordered structure on the solubility and dissolution rates of some hydrophilic, sparingly soluble drugs. *Int J Pharm*. 1999;**177**(1):29-51.

Munson EJ. Solubility of pharmaceutical solids. in: *Developing Solid Oral Dosage form* (Yihong Q, Yisheng C, Geoff Z, Lirong L, William PR, eds.), Elsevier, USA, pp 61-74, 2009.

Narang AS, Delmarre D, Gao D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *Int J Pharm.* 2007;**345**(1-2):9-25.

Oberle RL, Chen TS, Lloyd C, Barnett JL, Owyang C, Meyer J, Amidon GL. The influence of the interdigestive migrating myoelectric complex on the gastric emptying of liquids. *Gastroenterology.* 1990;**99**(5):1275-1282.

Overhoff KA, McConville JT, Yang W, Johnston KP, Peters JI, Williams R III. Effect of stabilizer on the maximum degree and extent of supersaturation and oral absorption of tacrolimus made by ultra-rapid freezing. *Pharm Res.* 2008;**25**(1):167-175.

Paulekuhn GS, Dressman JB, Saal C. Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection base on analysis of the orange book database. *J Med Chem.* 2007;**50**(26):6665-6672.

Persson EM, Gustafsson AS, Carlsson AS, Nilsson RG, Knutson L, Forsell P, Hanisch G, Lennernäs H, Abrahamsson B. The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids. *Pharm Res.* 2005;**22**(12):2141-2151.

Petrova RI, Peresykin A, Mortko CJ, McKeown AE, Lee J, Williams JM. Rapid conversion of API hydrates to anhydrous forms in aqueous media. *J Pharm Sci.* 2009;**98**(11):4111-4118.

Polster CS, Atassi F, Wu S, Sperry DC. Use of artificial stomach duodenum model for investigation of dosing fluid effect on clinical trial variability. *Mol Pharm.* 2010;**7**(5):1533-1538.

Pouton CW, Porter CJH. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;**60**(6):625-637.

Pudipeddi M, Serajuddin ATM, Grant DJW, Stahl PH. Solubility and dissolution of weak acids, bases, and salts. in: Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Stahl PH, Wermuth CG, eds.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 19-39, 2002.

Reppas C, Augustijns P. Drug solubility in the gastrointestinal tract. in: Oral Drug Absorption, 2<sup>nd</sup> ed. (Dressman JB, and Reppas C, eds.), Informa Healthcare, USA, pp 155-167, 2010.

Salonen J, Laitinen L, Kaukonen AM, Tuura J, Björkqvist M, Heikkilä T, Vähä-Heikkilä K, Hirvonen J, Lehto V. Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: Loading and release of five model drugs. *J Control Release.* 2005;**108**(2-3):362-374.

Sassene PJ, Knopp MM, Hesselkilde JZ, Koradia V, Larsen A, Rades T, Müllertz A. Precipitation of a poorly soluble model drug during in vitro lipolysis: characterization and dissolution of the precipitate. *J Pharm Sci.* 2010;**99**(12):4982-4991.

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.

Serajuddin ATM. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;**59**(7):603-616.

Serajuddin ATM, Mufson D. pH-solubility profiles of organic bases and their hydrochloride salts. *Pharm Res.* 1985;**2**(2):65-68.

Shono Y, Jantratid E, Dressman JB. Precipitation in the small intestine may play a more important role in the in vivo performance of poorly soluble weak bases in the fasted state: case example nelfinavir. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;**79**(2):349-356.

Six K, Daems T, de Hoon J, Van Hecken A, Depre M, Bouche M, Prinsen P, Verreck G, Peeters J, Brewster ME, Van den Mooter G. Clinical study of solid dispersions of itraconazole prepared by hotstage extrusion. *Eur J Pharm Sci.* 2005;**24**(2-3):179-186.

Stegenmann S, Leveiller F, Franchi D, de Jong H, Linden H. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. *Eur J Pharm Sci.* 2007;**31**(5):249-261.

Stella VJ, Nti-Addae KW. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;**59**(7):677-694.

Streng WH, Hsi SK, Helms PE, Tan HG. General treatment of pH–solubility profiles of weak acids and bases and the effects of different salts on the solubility of a weak base. *J Pharm Sci.* 1984;**73**(12):1679-1684.

Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* 2004;**21**(2):201-230.

Strickley RG, Oliyai R. Solubilizing vehicles for oral formulation development. in: Solvent systems and their selection in phramaceutics and biophramaceutics (Augustijns P, Brewster ME, eds.), AAPS Press and Springer, New York, pp 257-308, 2007.

Sugano K. A simulation of oral absorption using classical nucleation theory. *Int J Pharm.* 2009;**378**(1-2):142-145.

Sugano K. Computational oral absorption simulation of free base drugs. *Int J Pharm.* 2010;**398**(1-2):73-82.

Sugano K, Kato T, Suzuki K, Keiko K, Sujaku T, Mano T. High throughput solubility measurement with automated polarized light microscopy analysis, *J Pharm Sci.* 2006;**95**(10):2115-2122.

Tian F, Zhang F, Sandler N, Gordon KC, McGoverin CM, Strachan CJ, Saville DJ, Rades T. Influence of sample characteristics on quantification of carbamazepine hydrate formation by X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;**66**(3):466-474.

Tomilo DL, Smith PF, Ogundele AB, Difrancesco R, Berenson CS, Eberhardt E, Bednarczyk E, Morse GD. Inhibition of atazanavir oral absorption by lansoprazole gastric acid suppression in healthy volunteers. *Pharmacotherapy.* 2006;**26**(3):341-346.

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.

Urbanetz NA, Lippold BC. Solid dispersions of nimodipine and polyethylene glycol 2000: Dissolution properties and physico-chemical characterisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;**59**(1):107-118.

Van Eerdenbrugh B, Alonzo DE, Taylor LS. Influence of Particle Size on the Ultraviolet Spectrum of Particulate-Containing Solutions: Implications for In-Situ Concentration Monitoring Using UV/Vis Fiber-Optic Probes. *Pharm Res.* 2011;**28**(7):1643-1652.

Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today.* 2007;**12**(23-24):1068-1075.



Venkatramana RM, Sanghi R, Haijian Z. Solubility of pharmaceutical solids. in: *Developing Solid Oral Dosage form* (Yihong Q, Yisheng C, Geoff Z, Lirong L, William PR, eds.), Elsevier, USA, pp 3-24, 2009.

Vertzoni M, Archontaki H, Reppas C. Determination of intraluminal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection. *J Lipid Res.* 2008;**49**(12): 2690-2695.

Vertzoni M, Diakidou A, Chatziliadis M, Söderlind E, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Biorelevant media to simulate fluids in the ascending colon of humans and their usefulness in predicting intracolonic drug solubility. *Pharm Res.* 2010;**27**(10):2187-2196.

Vertzoni M, Pastelli E, Psachoulas D, Kalantzi L, Reppas C. Estimation of intragastric solubility of drugs: in what medium? *Pharm Res.* 2007;**24**(5):909-917.

Vogt M, Vertzoni M, Kunath K, Reppas C, Dressman JB. Cogrinding enhances the oral bioavailability of EMD 57033, a poorly water soluble drug, in dogs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;**68**(2):338-345.

Völgyi G, Baka E, Box KJ, Comer JE, Takács-Novák K. Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch relationship. *Anal Chim Acta.* 2010;**673**(1):40-46.

Watanabe T, Hasegawa S, Wakiyama N, Kusai A, Senna M. Prediction of apparent equilibrium solubility of indomethacine compounded with silica by <sup>13</sup>C solid state NMR. *Int J Pharm.* 2002;**248**(1-2):123-129.

Wenlock MC, Austin RP, Barton P, Davis AM, Leeson PD. A comparison of physicochemical property profiles of development and marketed oral drugs. *J Med Chem.* 2003;**46**(7):1250-1256.

Weuts I, Van Dycke F. Physicochemical properties of the amorphous drug, cast films, and spray dried powders to predict formulation probability of success for solid dispersions: etravirine. *J Pharm Sci.* 2011;**100**(1):260-274.

Willems L, van der Geest R, de Beule K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: A review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Clin Pharm Ther.* 2001;**26**(3):159-169.

## Παράρτημα 1

### Μέθοδοι προσδιορισμού δραστικών ουσιών, χολικών αλάτων, λιπιδίων και ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου των δειγμάτων

#### Π1.1 Μέθοδοι προσδιορισμού δραστικών ουσιών

##### Π1.1.1 DPD

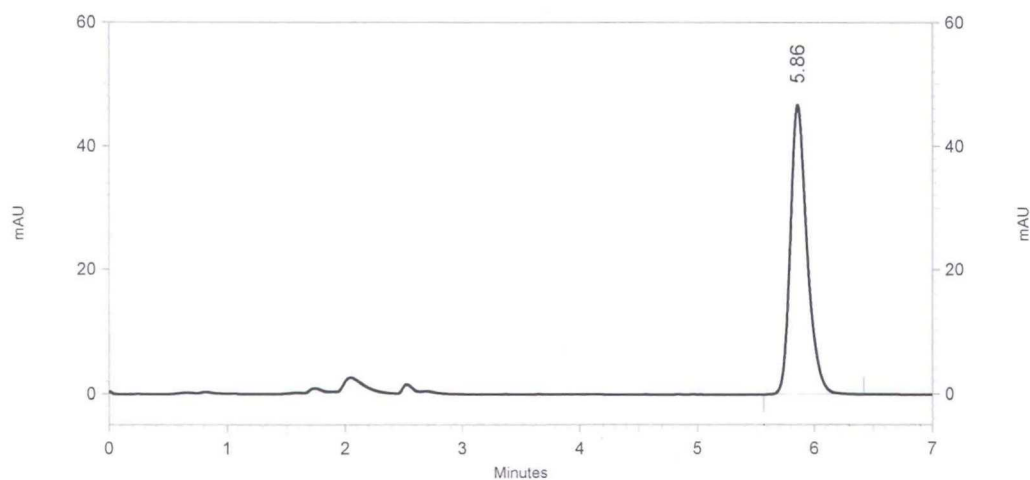
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης DPD στα δείγματα εφαρμόστηκε μια μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή UV/vis, η οποία βασίστηκε σε δημοσιευμένη μέθοδο (Vertzoni et al. 2007) με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Στήλη: BDS C<sub>18</sub> (250×4,6 mm, 5 μm) με προστήλη BDS C<sub>18</sub> (10×4,6 mm, 5 μm)
- Κινητή φάση: Ακετονιτρίλο:Νερό:Διαθυλαμίνη 50:50:0,1 v/v/v
- Ροή: 1 mL/min
- Μήκος κύματος: 280 nm (UV)
- Όγκος έγχυσης: 20 μL

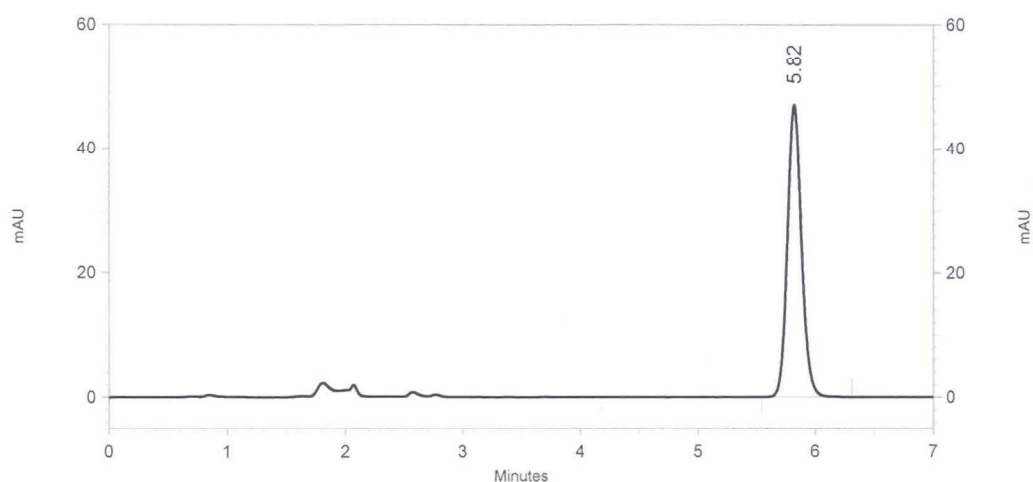
Στον Πίνακα Π1.1 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς σε κινητή φάση. Στα Σχήματα Π1.1, Π1.2 και Π1.3 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογράφηματα πρότυπου διαλύματος DPD σε κινητή φάση, από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης DPD στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #9, 5 min μετά τη χορήγηση του DPD-H, και στο διήθημα, που συλλέχθηκε από την *in vitro* διάταξη κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος 0-15 min, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί το DPD-H, αντίστοιχα.

**Πίνακας Π1.1:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς DPD σε κινητή φάση.

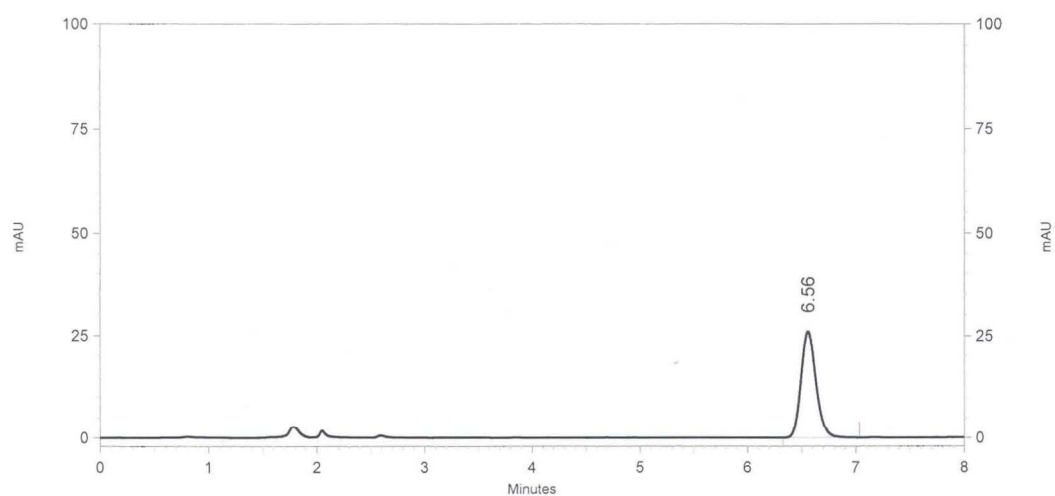
Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μg/mL)	Σημεία	Κλίση±SE	Τομή±SE	r <sup>2</sup>
#1	0,1-10	7	(5,289±0,048)×10 <sup>4</sup>	(1,9±2,5)×10 <sup>3</sup>	0,9996
#2	0,1-15	6	(5,178±0,029)×10 <sup>4</sup>	(-1,9±2,2)×10 <sup>3</sup>	0,9999
#3	1-25	6	(5,174±0,032)×10 <sup>4</sup>	(-1,01±0,49)×10 <sup>4</sup>	0,9998
#4	0,1-10	5	(5,135±0,012)×10 <sup>4</sup>	(-2,28±0,59)×10 <sup>3</sup>	0,99998
#5	0,1-10	5	(4,981±0,014)×10 <sup>4</sup>	(5,4±7,0)×10 <sup>2</sup>	1



**Σχήμα Π1.1:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος DPD (10 μg/mL) σε κινητή φάση (5,86 min).



**Σχήμα Π1.2:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης DPD στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #9, 5 min μετά τη χορήγηση του DPD-H (5,82 min).



**Σχήμα Π1.3:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης DPD στο διήθημα, που συλλέχθηκε από την *in vitro* διάταξη κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος 0-15 min, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί το DPD-H (6,56 min).

### Π1.1.2 KCZ

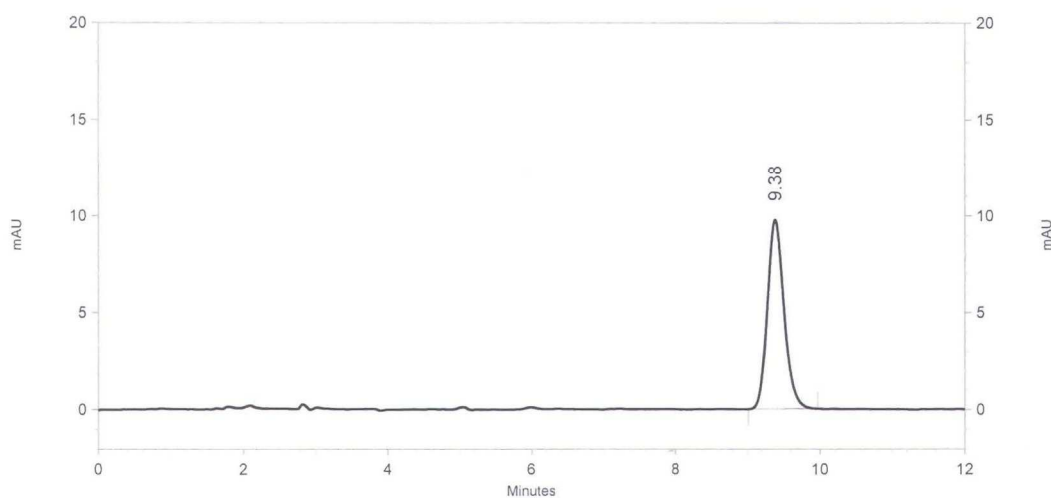
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης KCZ στα δείγματα εφαρμόστηκε μια μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή UV/vis, η οποία βασίστηκε σε δημοσιευμένη μέθοδο (Vertzoni et al. 2007) με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Στήλη: BDS C<sub>18</sub> (250×4,6 mm, 5 μm) με προστήλη BDS C<sub>18</sub> (10×4,6 mm, 5 μm)
- Κινητή φάση: Μεθανόλη:Νερό:Διαθυλαμίνη 74:26:0,1 v/v/v
- Ροή: 1 mL/min
- Μήκος κύματος: 240 nm (UV)
- Όγκος έγχυσης: 20 μL

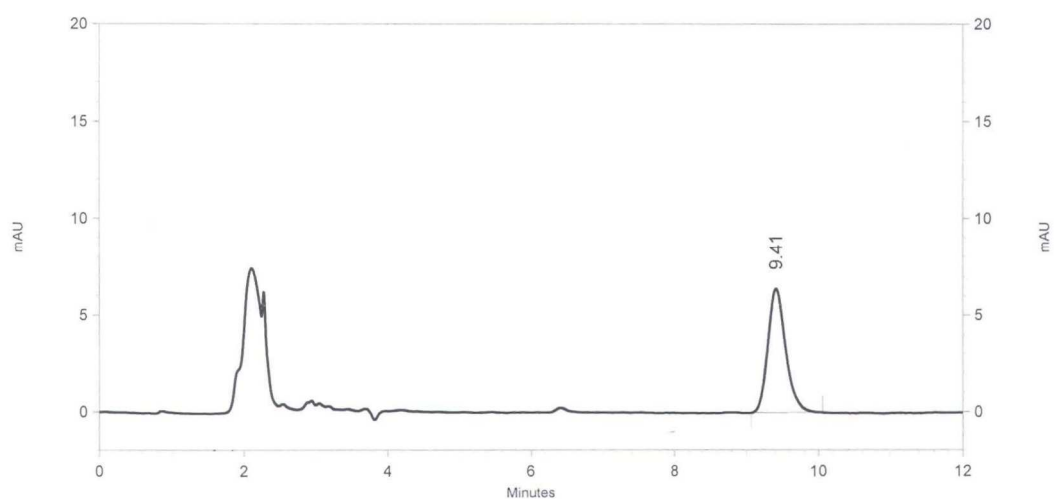
Στον Πίνακα Π1.2 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς σε κινητή φάση. Στα Σχήματα Π1.4, Π1.5 και Π1.6 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογράφηματα πρότυπου διαλύματος KCZ σε κινητή φάση, από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης KCZ στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #5, 30 min μετά τη χορήγηση του KCZ-L, και στο διήθημα, που συλλέχθηκε από την *in vitro* διάταξη κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος 0-15 min, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί το KCZ-H, αντίστοιχα.

**Πίνακας Π1.2:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς KCZ σε κινητή φάση.

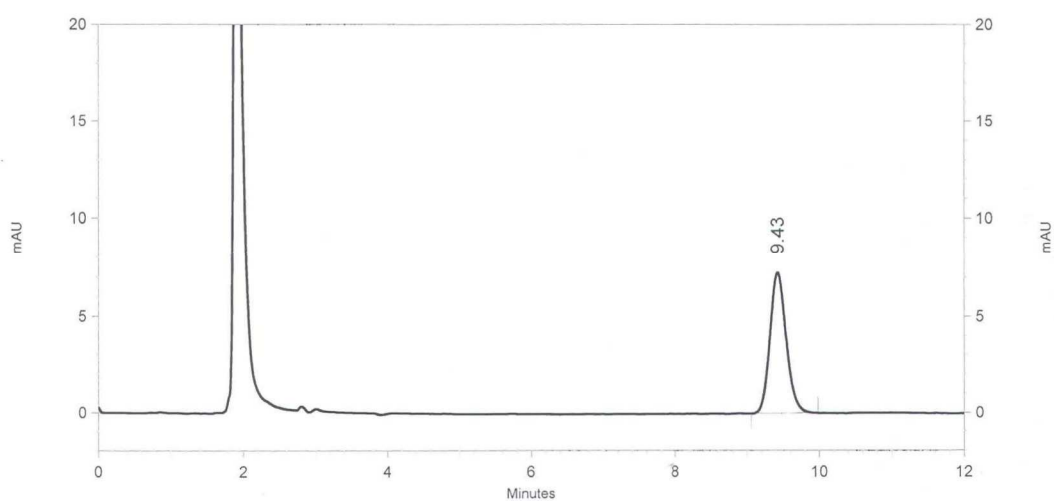
Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μg/mL)	Σημεία	Κλίση±SE	Τομή±SE	r <sup>2</sup>
#1	0,1-15	8	(3,424±0,027)×10 <sup>4</sup>	(-1,2±1,9)×10 <sup>3</sup>	0,9996
#2	0,1-25	8	(3,402±0,031)×10 <sup>4</sup>	(-3,2±4,1)×10 <sup>3</sup>	0,9995
#3	0,1-30	9	(3,550±0,016)×10 <sup>4</sup>	(-2,5±2,6)×10 <sup>3</sup>	0,9999
#4	0,1-30	9	(3,452±0,024)×10 <sup>4</sup>	(-2,7±3,8)×10 <sup>3</sup>	0,9997
#5	0,1-30	7	(3,549±0,041)×10 <sup>4</sup>	(-5,8±5,9)×10 <sup>3</sup>	0,9993



**Σχήμα Π1.4:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος KCZ (5 μg/mL) σε κινητή φάση (9,38 min).



**Σχήμα Π1.5:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης KCZ στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #5, 30 min μετά τη χορήγηση του KCZ-L (9,41 min).



**Σχήμα Π1.6:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης KCZ στο διήθημα, που συλλέχθηκε από την *in vitro* διάταξη κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος 0-15 min, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί το KCZ-H (9,43 min).



### Π1.1.3 AZD

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης AZD εφαρμόστηκε μια μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή UV/vis, η οποία βασίστηκε σε μέθοδο, που προτάθηκε από τον προμηθευτή, με όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)<sup>1</sup> 50 ng/mL και τα εξής χαρακτηριστικά:

- Στήλη: BDS C<sub>18</sub> (250×4,6 mm, 5 μm) με προστήλη BDS C<sub>18</sub> (10×4,6 mm, 5 μm)
- Κινητή φάση: Ακετονιτρίλιο:Νερό:Διαιθυλαμίνη 50:50:0,1 v/v/v
- Ροή: 1 mL/min
- Μήκος κύματος: 258 nm (UV)
- Όγκος έγχυσης: 20 μL

Στον Πίνακα Π1.3 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικής καμπύλης αναφοράς σε κινητή φάση.

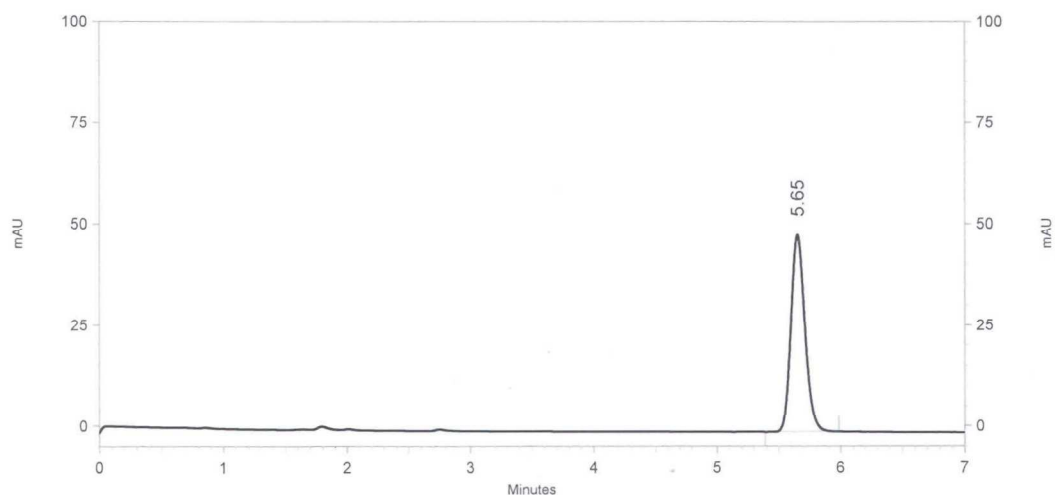
**Πίνακας Π1.3:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικής καμπύλης αναφοράς AZD σε κινητή φάση.

Εύρος συγκεντρώσεων (μg/mL)	Σημεία	Κλίση±SE	Τομή±SE	r <sup>2</sup>
1-10	5	(7,562±0,092)×10 <sup>4</sup>	(3,3±5,6)×10 <sup>3</sup>	0,9996

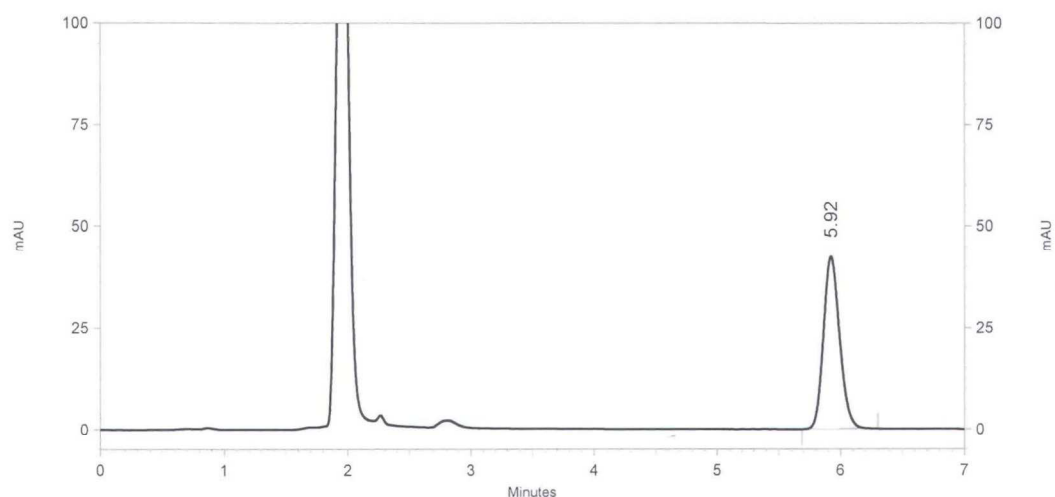
Στα Σχήματα Π1.7 και Π1.8 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογράφηματα πρότυπου διαλύματος AZD σε κινητή φάση, και από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης AZD στο δείγμα, που συλλέχθηκε από την *in vitro* διάταξη κατά τη

<sup>1</sup> Limit of Quantitation (Όριο ποσοτικοποίησης)

διάρκεια του χρονικού διαστήματος 45-60 min, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί το AZD-2, αντίστοιχα.



**Σχήμα Π1.7:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος AZD (5 µg/mL) σε κινητή φάση (5,65 min).



**Σχήμα Π1.8:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης AZD στο διήθημα, που συλλέχθηκε από την *in vitro* διάταξη κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος 45-60 min, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί το AZD-2 (5,92 min).

### Π1.1.4 SB

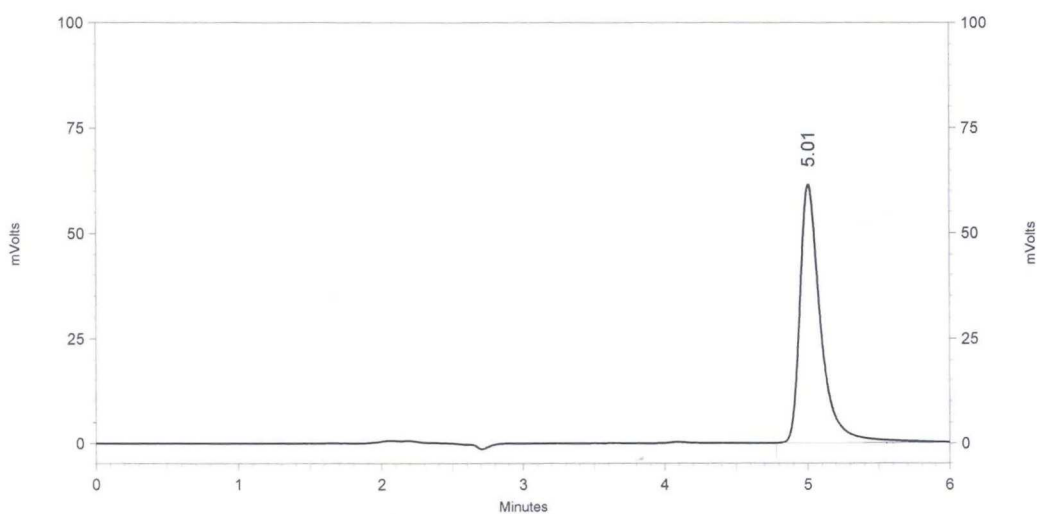
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης SB εφαρμόστηκε μια μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή UV/vis, η οποία βασίστηκε σε μέθοδο, που προτάθηκε από τον προμηθευτή, με LOQ 40 ng/mL και με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Στήλη: BDS C<sub>18</sub> (250×4,6 mm, 5 μm) με προστήλη BDS C<sub>18</sub> (10×4,6 mm, 5 μm)
- Κινητή φάση: Ακετονιτρίλιο:Νερό:Τριφθοροοξικό οξύ 50:50:0,1 v/v/v
- Ροή: 1 mL/min
- Μήκος κύματος: 240 nm (UV)
- Όγκος έγχυσης: 50 μL

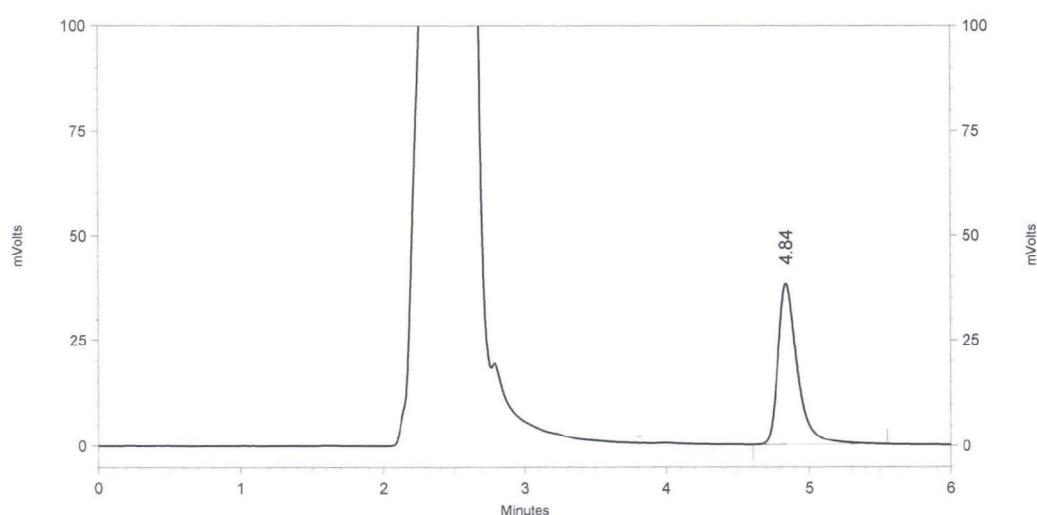
Στον Πίνακα Π1.4 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς σε κινητή φάση. Στα Σχήματα Π1.9 και Π1.10 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος SB σε κινητή φάση, και από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης SB στο διήθημα, που συλλέχθηκε από την *in vitro* διάταξη κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος 15-30 min, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί το SB Διάλυμα 2, αντίστοιχα.

**Πίνακας Π1.4:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς SB σε κινητή φάση.

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μg/mL)	Σημεία	Κλίση±SE	Τομή±SE	r <sup>2</sup>
#1	0,1-3	6	$(2,326 \pm 0,011) \times 10^5$	$(-2,2 \pm 1,4) \times 10^3$	0,9999
#2	0,1-10	9	$(2,1564 \pm 0,0065) \times 10^5$	$(-4,8 \pm 3,0) \times 10^3$	0,99994
#3	0,1-1	5	$(2,106 \pm 0,013) \times 10^5$	$(-3,0 \pm 8,0) \times 10^2$	0,9999
#4	1-10	5	$(2,246 \pm 0,016) \times 10^5$	$(-1,75 \pm 0,95) \times 10^4$	0,9999
#5	0,1-10	9	$(2,2732 \pm 0,0034) \times 10^5$	$(-1,1 \pm 1,5) \times 10^3$	0,99998



**Σχήμα Π1.9:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος SB (3 μg/mL) σε κινητή φάση (5,01 min).



**Σχήμα Π1.10:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης SB στο διήθημα, που συλλέχθηκε από την *in vitro* διάταξη κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος 15-30 min, όταν στο γαστρικό διαμέρισμα είχε τοποθετηθεί το SB Διάλυμα 2 (4,84 min).

## Π1.2 Τεχνικές ανάλυσης φυσιολογικών συστατικών στα αναρροφηθέντα δείγματα

### Π1.2.1 Χολικά Άλατα

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χολικών αλάτων στα αναρροφηθέντα δείγματα εφαρμόστηκε μια μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φορτισμένου αερολύματος, η οποία βασίστηκε σε δημοσιευμένη μέθοδο (Vertzoni et al. 2008) με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Στήλη: BDS C<sub>18</sub> (250×4,6 mm, 5 μm) με προστήλη BDS C<sub>18</sub> (10×4,6 mm, 5 μm)
- Κινητή φάση: Μεθανόλη:[Μυρμηκικό Αμμώνιο 20 mM, Μυρμηκικό οξύ 0,5 %, Τριαιθυλαμίνη 0,2 % (pH 3)] 67:33 v/v
- Ροή: 1 mL/min
- Όγκος έγχυσης: 50 μL

Στους Πίνακες Π1.5–Π1.11 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς σε κινητή φάση για τον προσδιορισμό των ταυροχολικού νατρίου, γλυκοχολικού οξέος, ταυροχηνοδοεξυχολικού νατρίου, ουρσοδεοξυχολικού οξέος, γλυκοχηνοδοεξυχολικού νατρίου, χολικού οξέος και γλυκοδεοξυχολικού νατρίου, αντίστοιχα.

**Πίνακας Π1.5:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς ταυροχολικού νατρίου σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	2-300	6	$(-3,14 \pm 0,86) \times 10$	$(5,34 \pm 0,26) \times 10^4$	$(6 \pm 11) \times 10^4$	0,9992
#2	1-400	9	$(-4,17 \pm 0,28) \times 10$	$(5,76 \pm 0,11) \times 10^4$	$(-9 \pm 65) \times 10^3$	0,9998
#3	2-300	7	$(-1,71 \pm 0,38) \times 10$	$(5,13 \pm 0,15) \times 10^4$	$(1,15 \pm 0,89) \times 10^5$	0,9996

**Πίνακας Π1.6:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς γλυκοχολικού οξέος σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	2-300	6	$(-2,87 \pm 0,55) \times 10$	$(5,21 \pm 0,16) \times 10^4$	$(2,9 \pm 7,1) \times 10^4$	0,9997
#2	1-400	9	$(-3,01 \pm 0,52) \times 10$	$(5,05 \pm 0,20) \times 10^4$	$(4 \pm 12) \times 10^4$	0,9992
#3	2-400	8	$(-1,59 \pm 0,41) \times 10$	$(4,82 \pm 0,16) \times 10^4$	$(8,9 \pm 9,5) \times 10^4$	0,9995

**Πίνακας Π1.7:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς ταυροχηνοδεοξυχολικού νατρίου σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	2-300	6	$(-2,13 \pm 0,88) \times 10$	$(5,80 \pm 0,26) \times 10^4$	$(6 \pm 11) \times 10^4$	0,9994
#2	1-400	9	$(-7,66 \pm 0,77) \times 10$	$(5,00 \pm 0,30) \times 10^4$	$(10 \pm 18) \times 10^4$	0,999
#3	2-400	8	$(-1,68 \pm 0,18) \times 10$	$(5,718 \pm 0,071) \times 10^4$	$(2,8 \pm 4,2) \times 10^4$	0,99993

**Πίνακας Π1.8:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς ουρσοδεοξυχολικού οξέος σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	2-300	6	$(-3,54 \pm 0,60) \times 10$	$(5,29 \pm 0,18) \times 10^4$	$(5,4 \pm 7,8) \times 10^4$	0,9996
#2	1-400	9	$(-2,73 \pm 0,14) \times 10$	$(4,748 \pm 0,052) \times 10^4$	$(-8 \pm 32) \times 10^3$	0,99994
#3	2-300	7	$(-5,95 \pm 0,27) \times 10$	$(4,16 \pm 0,10) \times 10^4$	$(1,75 \pm 0,62) \times 10^5$	0,9998

**Πίνακας Π1.9:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς γλυκοχηνοδεοξυχολικού νατρίου σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	5-300	5	$(-1,85 \pm 0,36) \times 10$	$(5,18 \pm 0,11) \times 10^4$	$(-1,3 \pm 4,7) \times 10^4$	0,99990
#2	1-400	9	$(-2,74 \pm 0,38) \times 10$	$(5,23 \pm 0,15) \times 10^4$	$(-8,4 \pm 8,9) \times 10^4$	0,9996
#3	2-300	7	$(-1,52 \pm 0,13) \times 10$	$(3,900 \pm 0,051) \times 10^4$	$(1,38 \pm 0,30) \times 10^5$	0,99996

**Πίνακας Π1.10:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς χολικού οξέος σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

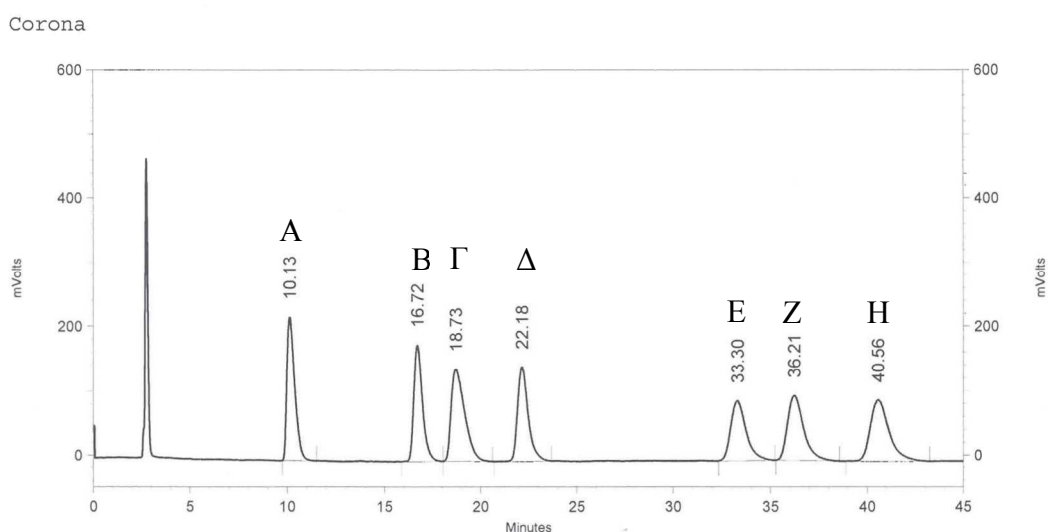
Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	5-300	5	$(-2,90 \pm 0,42) \times 10$	$(5,34 \pm 0,12) \times 10^4$	$(-4,3 \pm 5,4) \times 10^4$	0,9999
#2	1-400	9	$(-7,81 \pm 0,51) \times 10$	$(4,34 \pm 0,20) \times 10^4$	$(1,1 \pm 1,2) \times 10^5$	0,9993
#3	2-400	8	$(2,24 \pm 0,30) \times 10$	$(3,49 \pm 0,12) \times 10^4$	$(1,71 \pm 0,70) \times 10^5$	0,9997

**Πίνακας Π1.11:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς γλυκοδεοξυχολικού νατρίου σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

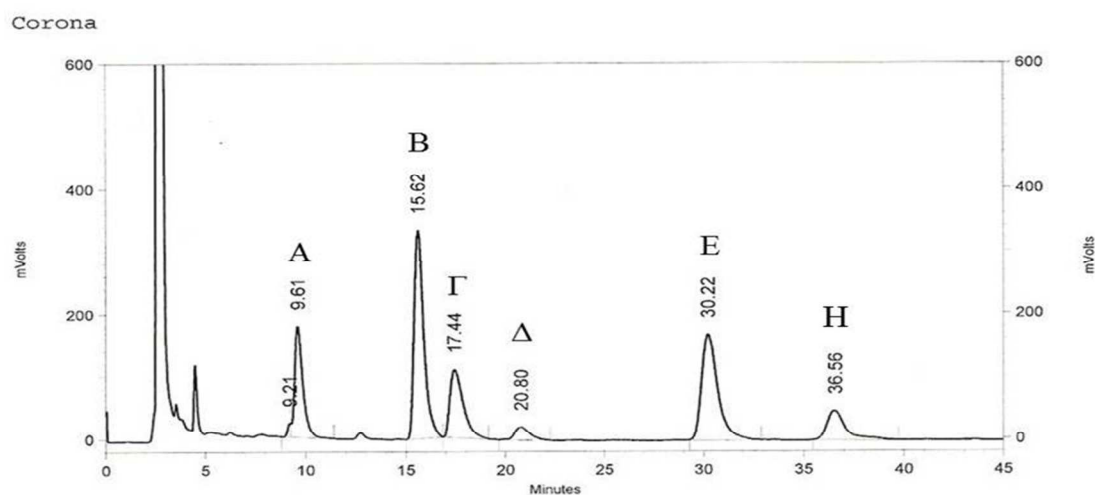
Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	5-300	5	$(-2,94 \pm 0,26) \times 10$	$(5,572 \pm 0,077) \times 10^4$	$(-1,57 \pm 0,34) \times 10^5$	0,99995
#2	1-400	9	$(-4,14 \pm 0,16) \times 10$	$(5,902 \pm 0,063) \times 10^4$	$(-7,3 \pm 3,8) \times 10^4$	0,99994
#3	2-400	8	$4,3 \pm 3,6$	$(4,32 \pm 0,14) \times 10^4$	$(1,92 \pm 0,84) \times 10^5$	0,9997

Στα Σχήματα Π1.11 και Π1.12 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των χολικών αλάτων/οξέων σε κινητή φάση, και στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #2, 20 min μετά τη χορήγηση του DPD-H, αντίστοιχα.





**Σχήμα Π1.11:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου μικτού διαλύματος χολικών αλάτων/οξέων που περιέχει ταυροχολικό νάτριο (A), γλυκοχολικό οξύ (B), ταυροχηνοδοεξυχολικό νάτριο (Γ), ουρσοδεοξυχολικό οξύ (Δ), γλυκοχηνοδοεξυχολικό οξύ (E), χολικό οξύ (Z) και γλυκοδεοξυχολικό νάτριο (H) σε κινητή φάση. Η συγκέντρωση κάθε χολικού άλατος/οξέος είναι 100 μM.



**Σχήμα Π1.12:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χολικών αλάτων στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #2, 20 min μετά τη χορήγηση του DPD-H. Το δείγμα περιέχει ταυροχολικό (A), γλυκοχολικό (B), ταυροχηνοδοεξυχολικό (Γ), ουρσοδεοξυχολικό (Δ), γλυκοχηνοδοεξυχολικό (E) και γλυκοδεοξυχολικό (H) άλας/οξύ. Σε σχέση με το πρότυπο διάλυμα (Σχήμα Π1.12) δεν περιέχει (<LOD<sup>2</sup>) χολικό οξύ.

<sup>2</sup> Limit of Detection (Όριο ανίχνευσης)

*Π1.2.2 Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, ελεύθερα λιπαρά οξέα, χοληστερόλη, μονογλυκερίδιο, διγλυκερίδιο, τριγλυκερίδιο και εστέρας της χοληστερόλης*

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, ελεύθερων λιπαρών οξέων (λινελαϊκό, παλμιτικό και στεατικό), χοληστερόλης, μονογλυκεριδίου (1-Μονελαϊκή γλυκερόλη), διγλυκεριδίου (Διπαλμιτική γλυκερόλη), τριγλυκεριδίου (Τριελαϊκή γλυκερόλη) και ελαϊκού εστέρα της χοληστερόλης στα αναρροφηθέντα δείγματα εφαρμόστηκε μια μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φορτισμένου αερολύματος, η οποία βασίστηκε σε δημοσιευμένη μέθοδο (Diakidou et al. 2009b) με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Στήλη: BDS C<sub>18</sub> (250×4,6 mm, 5 μm) με προστήλη BDS C<sub>18</sub> (10×4,6 mm, 5 μm)
- Ροή: 0,5 mL/min
- Όγκος εγχυσης: 50 μL
- Κανάλι Α: Μεθανόλη:Ακετονιτρίλιο:Ρυθμιστικό Διάλυμα μυρμηκικών [Μυρμηκικό Αμμώνιο 20 mM, Μυρμηκικό οξύ 0,5 %, Τριαιθυλαμίνη 0,2 % (pH 3)] 65:25:10 v/v/v
- Κανάλι Β: 2-Προπανόλη
- Κινητή φάση:

Χρόνος (min)	% A	% B
0	100	0
30	100	0
32	50	50
52	50	50
57	30	70
100	0	100
110	100	0
120	100	0

Στους Πίνακες Π1.12–Π1.20 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς σε κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, λινελαϊκού οξέος, μονογλυκεριδίου (1-Μονελαϊκή γλυκερόλη), παλμιτικού οξέος, στεατικού οξέος, χοληστερόλης, διγλυκεριδίου (Διπαλμιτική γλυκερόλη), τριγλυκεριδίου (Τριελαϊκή γλυκερόλη) και ελαϊκού εστέρα της χοληστερόλης στα αναρροφηθέντα δείγματα, αντίστοιχα.

**Πίνακας Π1.12:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς λυσοφωσφατιδυλοχολίνης σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	10-80	4	$(-3,68 \pm 0,46) \times 10^2$	$(1,581 \pm 0,043) \times 10^5$	$(-5,45 \pm 0,71) \times 10^5$	0,99995
#2	10-100	5	$(-1,68 \pm 0,78) \times 10^2$	$(1,320 \pm 0,086) \times 10^5$	$(-3,0 \pm 1,8) \times 10^5$	0,9995
#3	10-100	5	$(-1,1 \pm 9,3) \times 10^1$	$(1,11 \pm 0,10) \times 10^5$	$(3,2 \pm 2,1) \times 10^5$	0,9993

**Πίνακας Π1.13:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς λινελαϊκού οξέος σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	10-80	4	$(-2,42 \pm 0,68) \times 10^2$	$(9,06 \pm 0,63) \times 10^4$	$(-9 \pm 104) \times 10^3$	0,9997
#2	10-80	4	$(-2,88 \pm 0,79) \times 10^2$	$(9,56 \pm 0,87) \times 10^4$	$(-10 \pm 18) \times 10^4$	0,9990
#3	10-100	5	$(-1,03 \pm 0,63) \times 10^2$	$(6,86 \pm 0,70) \times 10^4$	$(8,0 \pm 1,4) \times 10^5$	0,999

**Πίνακας Π1.14:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς μονογλυκεριδίου (1-Μονοελαϊκή γλυκερόλη) σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b\pm SE$	$a\pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	10-80	4	$(-2,5\pm 1,2)\times 10^2$	$(1,25\pm 0,11)\times 10^5$	$(2\pm 18)\times 10^4$	0,9996
#2	10-100	5	$(-3,59\pm 0,75)\times 10^2$	$(1,323\pm 0,083)\times 10^5$	$(1,3\pm 1,7)\times 10^5$	0,9993
#3	10-100	5	$(-3,55\pm 0,10)\times 10^2$	$(1,333\pm 0,011)\times 10^5$	$(1,9\pm 2,3)\times 10^4$	0,99998

**Πίνακας Π1.15:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς παλμιτικού οξέος σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b\pm SE$	$a\pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	10-100	5	-1,2±1,2	$(1,58\pm 0,14)\times 10^3$	$(3,3\pm 2,8)\times 10^3$	0,9992
#2			-5,4±2,7	$(1,86\pm 0,29)\times 10^3$	$(3,6\pm 6,0)\times 10^3$	0,996
#3			-1,4±2,6	$(1,34\pm 0,28)\times 10^3$	$(1,76\pm 0,58)\times 10^4$	0,995

**Πίνακας Π1.16:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς στεατικού οξέος σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b\pm SE$	$a\pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	10-80	4	$(-1,1\pm 1,4)\times 10^2$	$(1,04\pm 0,13)\times 10^5$	$(3,4\pm 2,2)\times 10^5$	0,9992
#2	10-100	5	$(-5,44\pm 0,90)\times 10^2$	$(1,383\pm 0,100)\times 10^5$	$(-1,6\pm 2,0)\times 10^5$	0,999
#3	10-100	5	$(-4,69\pm 0,87)\times 10^2$	$(1,288\pm 0,096)\times 10^5$	$(8\pm 20)\times 10^4$	0,999

**Πίνακας Π1.17:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς χοληστερόλης σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	b±SE	a±SE	y <sub>0</sub>	r <sup>2</sup>
#1	10-80	4	$(-2,95±0,84)×10^2$	$(1,831±0,077)×10^5$	$(3±13)×10^4$	0,99990
#2	10-100	5	$(-5,3±1,9)×10^2$	$(1,93±0,21)×10^5$	$(1,9±4,3)×10^5$	0,998
#3	10-100	5	$(-3,1±1,3)×10^2$	$(1,65±0,15)×10^5$	$(9,0±3,1)×10^5$	0,999

**Πίνακας Π1.18:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς διγλυκεριδίου (Διπαλμιτική γλυκερόλη) σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	b±SE	a±SE	y <sub>0</sub>	r <sup>2</sup>
#1	10-80	4	$(-1,051±0,033)×10^3$	$(3,069±0,030)×10^5$	$(1,06±0,50)×10^5$	0,99999
#2	10-100	5	$(-1,40±0,28)×10^3$	$(3,17±0,31)×10^5$	$(-2,5±6,4)×10^5$	0,997
#3	10-100	5	$(-1,39±0,27)×10^3$	$(3,14±0,30)×10^5$	$(-1,1±6,2)×10^5$	0,9992

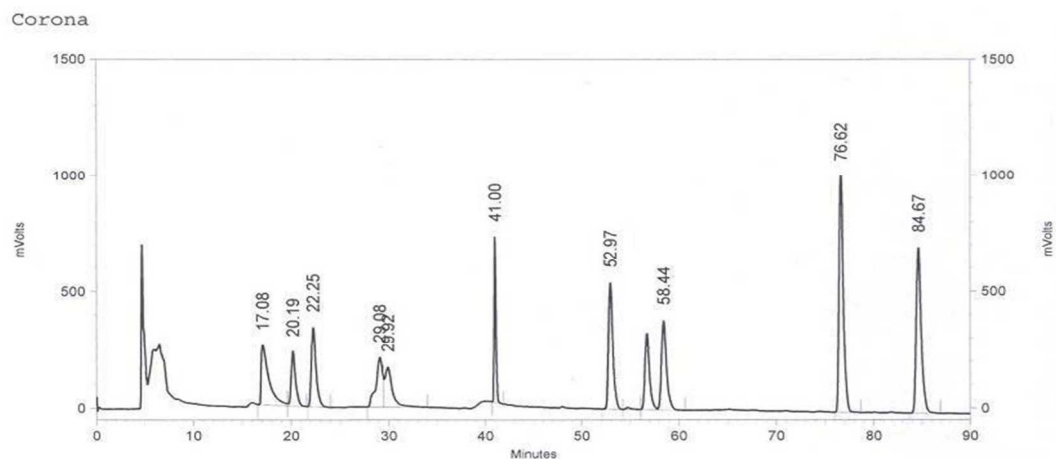
**Πίνακας Π1.19:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς τριγλυκεριδίου (Τριελαϊκή γλυκερόλη) σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	b±SE	a±SE	y <sub>0</sub>	r <sup>2</sup>
#1	10-80	4	$(-8,9±3,7)×10^2$	$(3,83±0,34)×10^5$	$(7,1±5,7)×10^5$	0,9995
#2	10-100	5	$(-1,54±0,26)×10^3$	$(4,41±0,29)×10^5$	$(3±59)×10^4$	0,9991
#3	10-100	5	$(-1,506±0,086)×10^3$	$(4,407±0,095)×10^5$	$(-1,5±1,9)×10^5$	0,9999

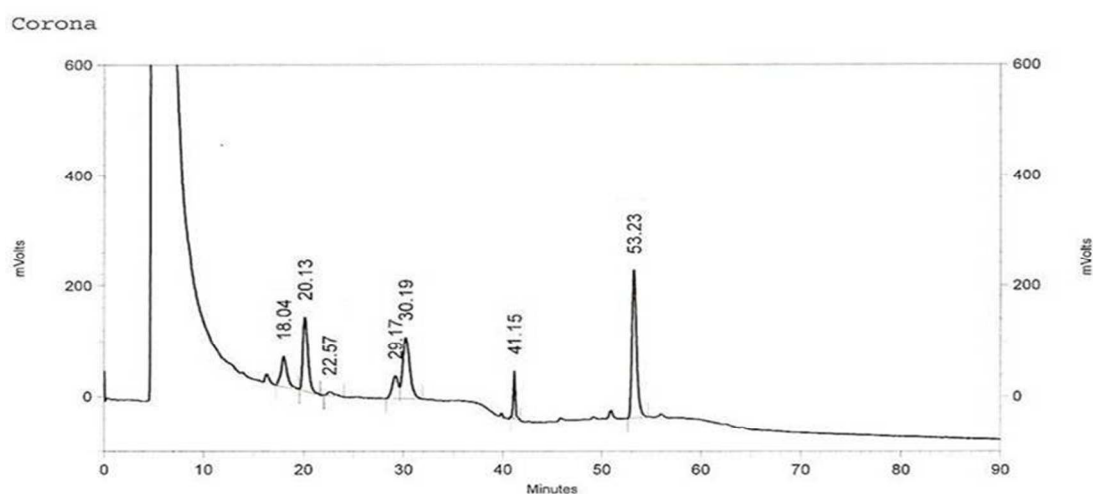
**Πίνακας Π1.20:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς ελαϊκού εστέρα της χοληστερόλης σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	10-80	4	$(-7,4 \pm 2,1) \times 10^2$	$(3,16 \pm 0,20) \times 10^5$	$(4 \pm 33) \times 10^4$	0,9998
#2	10-100	5	$(-1,04 \pm 0,24) \times 10^3$	$(3,38 \pm 0,27) \times 10^5$	$(-8 \pm 54) \times 10^4$	0,999
#3	10-100	5	$(-9,60 \pm 0,26) \times 10^2$	$(3,300 \pm 0,028) \times 10^5$	$(3 \pm 578) \times 10^2$	0,99999

Στα Σχήματα Π1.13 και Π1.14 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογράφηματα πρότυπου μικτού διαλύματος, που περιέχει λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, ελεύθερα λιπαρά οξέα (λινελαϊκό, παλμητικό και στεατικό οξύ), χοληστερόλη, μονογλυκερίδιο (1-Μονοελαϊκή γλυκερόλη), διγλυκερίδιο (Διπαλμιτική γλυκερόλη), τριγλυκερίδιο (Τριελαϊκή γλυκερόλη) και ελαϊκό εστέρα της χοληστερόλης, και από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αυτών στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #2, 5 min μετά τη χορήγηση του KCZ-H, αντίστοιχα.



**Σχήμα Π1.13:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου μικτού διαλύματος, που περιέχει λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (17,08 min), ελεύθερα λιπαρά οξέα [λινελαϊκό (20,19 min), παλμιτικό (29,92 min) και στεατικό (41,00 min) οξύ], χοληστερόλη (52,97 min), μονογλυκερίδιο (22,25 min), διγλυκερίδιο (55-60 min), τριγλυκερίδιο (76,62 min) και εστέρα της χοληστερόλης (84,67 min), σε κινητή φάση. Η συγκέντρωση κάθε λιπιδίου είναι 100 μM.



**Σχήμα Π1.14:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης λιπιδίων στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #2, 5 min μετά τη χορήγηση του KCZ-H. Το δείγμα περιέχει λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (18,04 min), ελεύθερα λιπαρά οξέα [λινελαϊκό (20,13 min), παλμιτικό (30,19 min) και στεατικό (41,15 min) οξύ], χοληστερόλη (53,23 min) και μονογλυκερίδιο (22,57 min). Σε σχέση με τα πρότυπα διαλύματα (Σχήμα Π1.13) δεν περιέχει (<LOD) διπαλμιτική γλυκερόλη, τριελαϊκή γλυκερόλη και ελαϊκό εστέρα της χοληστερόλης.

### Π1.2.3 Φωσφατιδυλοχολίνη

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης φωσφατιδυλοχολίνης στα αναρροφηθέντα δείγματα εφαρμόστηκε μια μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φορτισμένου αερολύματος, η οποία βασίστηκε σε δημοσιευμένη μέθοδο (Diakidou et al. 2009b) με χαρακτηριστικά ίδια με αυτά, που αναφέρονται στο Κεφ. (Π1.2.2).

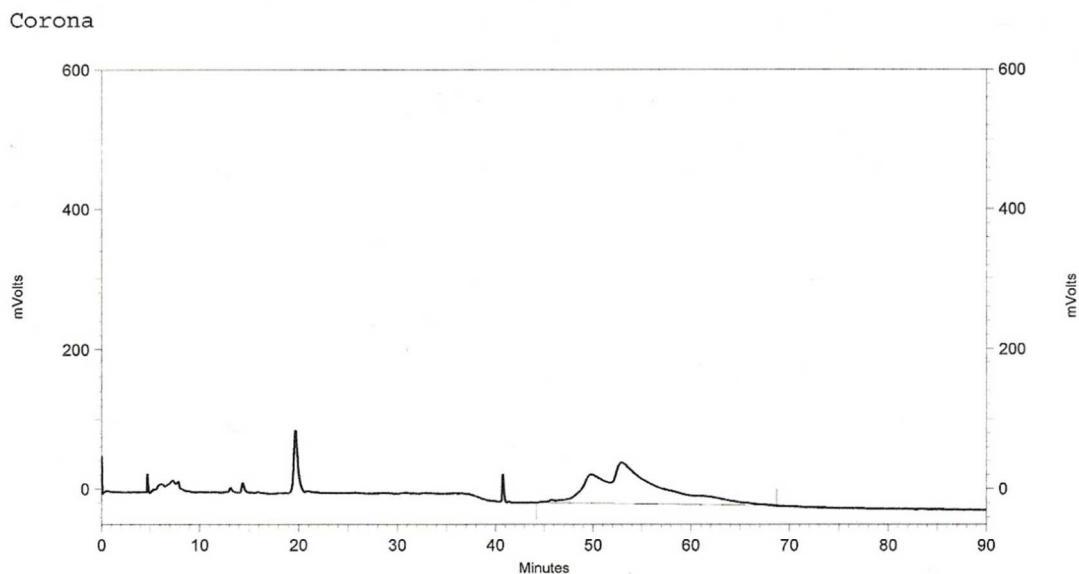
Στον Πίνακα Π1.21 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικής καμπύλης αναφοράς σε κινητή φάση.

**Πίνακας Π1.21:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικής καμπύλης αναφοράς φωσφατιδυλοχολίνης σε κινητή φάση ( $y=bx^2+ax+y_0$ ).

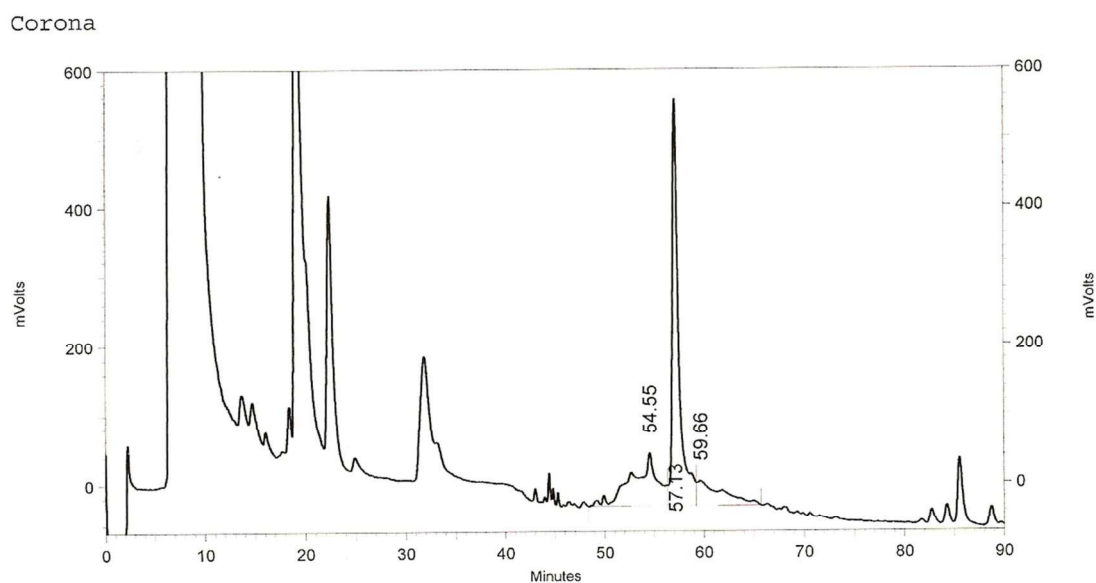
Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)	Σημεία	$b \pm SE$	$a \pm SE$	$y_0$	$r^2$
#1	5-250	7	$(-3,73 \pm 0,34) \times 10^2$	$(4,119 \pm 0,087) \times 10^5$	$(6,24 \pm 0,36) \times 10^6$	0,9998

Στα Σχήματα Π1.15 και Π1.16 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογράφηματα πρότυπου διαλύματος φωσφατιδυλοχολίνης σε κινητή φάση και από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της φωσφατιδυλοχολίνης στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #12, 50 min μετά τη χορήγηση του KCZ-L, αντίστοιχα.





**Σχήμα Π1.15:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος φωσφατιδυλοχολίνης (50  $\mu$ M) σε κινητή φάση (47,0-65,0 min).



**Σχήμα Π1.16:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης φωσφατιδυλοχολίνης στο υπερκείμενο από το δείγμα, που αναρροφήθηκε από τον εθελοντή #12, 50 min μετά τη χορήγηση του KCZ-L. Η συγκέντρωση φωσφατιδυλοχολίνης στο δείγμα ανιστοιχεί στο εμβαδόν, που προκύπτει από το άθροισμα των εμβαδών, που δημιουργούνται μεταξύ του χρωματογραφήματος και των χρονικών διαστημάτων 47,0-57,0 και 59,0-65,0, αντίστοιχα.

### *Π1.2.4 Ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο*

Το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο στα αναρροφηθέντα δείγματα προσδιορίστηκε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου κιτίου (kit) για τη μέτρηση πρωτεϊνών.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε βόεια αλβουμίνη ορού, η οποία ήταν συμπεριλαμβατόταν στο κιτίο και είχε περιεκτικότητα 2 mg/mL. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από αραιώση της βόειας αλβουμίνης ορού με απιονισμένο νερό. Σε 500  $\mu$ L πρότυπου διαλύματος ή δείγματος προστέθηκαν 500  $\mu$ L Reagent 1. Μετά από ανάδευση με αναδευτήρα περιδίνησης και πεντάλεπτη αναμονή προστέθηκαν 500  $\mu$ L Reagent 2 και ακολούθησε ανάδευση με αναδευτήρα περιδίνησης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (4 °C, 10920  $\times$  g, 20 min) και απόρριψη του υπερκειμένου. Στο ίζημα προστέθηκαν 100  $\mu$ L νερό καθαρότητας HPLC, και μετά από ανάδευση με αναδευτήρα περιδίνησης προστέθηκαν 2 mL Working Reagent (WR, αποτελούμενο από Reagents 1 και 2 σε αναλογία 50:1). Ακολούθησε επώαση του διαλύματος στους 37 °C για 30 min και μέτρηση της απορρόφησης του σε μήκος κύματος 562 nm. Ως λευκό διάλυμα χρησιμοποιείται το διάλυμα το οποίο προέκυψε με την ίδια κατεργασία, αλλά, αρχικά, αντί για 500  $\mu$ L δείγματος ή πρότυπου διαλύματος βόειας αλβουμίνης ορού χρησιμοποιήθηκαν 500  $\mu$ L απιονισμένου νερού. Η απορρόφηση του λευκού διαλύματος αφαιρούταν από την αντίστοιχη των δειγμάτων ή των πρότυπων διαλυμάτων. Το LOQ της μεθόδου (50  $\mu$ g/mL) προσδιορίστηκε πειραματικά με παρασκευή έξι πρότυπων διαλυμάτων με θεωρητική συγκέντρωση 50  $\mu$ g/mL και υπολογισμό του συντελεστή μεταβλητότητας (coefficient of variance).

Στον Πίνακα Π1.22 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς για τον προσδιορισμό του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου.

**Πίνακας Π1.22:** Χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς για τον προσδιορισμό του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου των δειγμάτων.

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (μg/mL)	Σημεία	Κλίση±SE	Τομή±SE	r <sup>2</sup>
#1	50-600	6	$(1,259 \pm 0,025) \times 10^{-3}$	$(2,82 \pm 0,83) \times 10^{-2}$	0,998
#2	50-600	7	$(1,265 \pm 0,024) \times 10^{-3}$	$(9,5 \pm 7,4) \times 10^{-3}$	0,998
#3	50-600	7	$(1,267 \pm 0,011) \times 10^{-3}$	$(1,57 \pm 0,33) \times 10^{-2}$	0,9996
#4	50-600	7	$(1,241 \pm 0,035) \times 10^{-3}$	$(1,3 \pm 1,1) \times 10^{-2}$	0,996
#5	50-600	7	$(1,300 \pm 0,020) \times 10^{-3}$	$(1,21 \pm 0,63) \times 10^{-2}$	0,999

## **Παράρτημα 2**

### **Αντίγραφα εγγράφων που αφορούν στην αδειοδότηση και λήξη πραγματοποίησης της κλινικής μελέτης GR210181**



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΚΟΙΝ. ΑΛΛΗΛΕΓΓΥΗΣ  
ΕΘΝΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ  
ΜΕΣΣΟΓΕΙΩΝ 284, ΧΟΛΑΡΓΟΣ 155 62

Διεύθυνση: Φαρμ/κών Μελετών & Έρευνας  
Δ/ντρια: Μιράντα Σιούτη, MD, PhD  
Τμήμα Κλινικών Δοκιμών  
Προϊσταμένη: Ευγενία Φούζα, Φαρμακοποιός  
Πληροφορίες: Ε. Σαρίκα, Φαρμακοποιός

Χολαργός, 19-12-08

Αρ. Πρωτ. 66929

Προς: κ. Χρήστο Ρέππα  
Εθν. και Καποδ. Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Τμήμα Φαρμακευτικής,  
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου,  
15771, Αθήνα

**Θέμα : Γνωστοποίηση αποδοχής για την διεξαγωγή  
παρεμβατικής κλινικής δοκιμής (μη εμπορική)  
(άρθρο 8 της Υπ. Απ. ΔΥΓ3/89292/31-12-2003)**

Σε απάντηση της υπ' αριθμ. 66929/16-10-2008 αίτησης σας και σύμφωνα με την Υπ. Απόφαση ΔΥΓ3/89292/31-12-2003, άρθρο 8, σας γνωρίζουμε ότι:  
Μετά την ολοκλήρωση της αξιολόγησης του φακέλου σας από το τμήμα Κλινικών Δοκιμών του ΕΟΦ σας γνωστοποιούμε ότι δεν υπάρχουν αντιρρήσεις για την διεξαγωγή της κλινικής μελέτης, **με την προϋπόθεση ότι έχει προηγουμένως γνωμοδοτήσει θετικά η Εθνική Επιτροπή Δεοντολογίας.**

Χορηγός: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (κ. Χρήστος Ρέππας)  
Στοιχεία αιτούντος: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (κ. Χρήστος Ρέππας)

Στοιχεία της Μελέτης:

Κωδικός ΕΟΦ: IS-111 / 01 / 08

Αριθμός Eudra CT: 2008-006178-13

Πλήρης τίτλος της μελέτης: << In vivo διερεύνηση της καθίζησης των ασθενών βάσεων στον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών >>.

Κωδικός Αριθμός, Έκδοση και Ημερομηνία του Πρωτοκόλλου:  
GR210181, 15-7-2008

Έντυπο Συγκατάθεσης μετά από Ενημέρωση:  
GR210181, 15-7-2008

Υπεύθυνος παρακολούθησης της μελέτης : κ. Χρήστος Ρέππας

Προβλεπόμενος αριθμός συμμετεχόντων : 12

Διάρκεια της Μελέτης : 1 έτος

IS-111/01/08

**Κέντρα διεξαγωγής της μελέτης και Υπεύθυνοι Ερευνητές:**

01) Γεν. Νοσοκ. Αθηνών "Κοργιαλένιο- Μπενάκειο" ΕΕΣ, Γαστρεντερολογικό Τμήμα,  
κ. Κωνσταντίνος Γκούμας.

**Οι υπεύθυνοι ερευνητές υποχρεούνται :**

- α) να εφαρμόζουν πλήρως τη σχετική Υπουργική Απόφαση ΔΥΓ3/89292/31-12-2003 και τους κανόνες της ορθής κλινικής πρακτικής,
- β) να τηρούν αρχείο με τα ατομικά δελτία και τις δηλώσεις συγκατάθεσης των ασθενών το οποίο να βρίσκεται στη διάθεση του ΕΟΦ,
- γ) να ενημερώνουν τον ΕΟΦ για την πρόοδο της δοκιμής και μετά το πέρας αυτής να υποβάλλουν λεπτομερή έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμής,
- δ) να καταγράφουν όλες τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούν κατά τη διάρκεια της κλινικής δοκιμής και να ενημερώνουν άμεσα τον χορηγό.

**Ο χορηγός υποχρεούται:**

- α) να εφαρμόζει πλήρως τη σχετική Υπουργική Απόφαση ΔΥΓ3/89292/31-12-2003 ,
- β) να χορηγήσει δωρεάν τα φάρμακα της μελέτης. Τα φάρμακα για την κλινική μελέτη διακινούνται στο Νοσοκομείο σύμφωνα με το άρθρο 12 της Υπ. Απόφασης ΔΥΓ3/89292/31-12-2003,
- γ) να ενημερώνει τον ΕΟΦ (τμήμα Ανεπιθυμητών Ενεργειών) το αργότερο εντός 7 ημερών για τις ύποπτες σοβαρές απροσδόκητες ανεπιθύμητες ενέργειες οι οποίες είναι θανατηφόρες ή απειλητικές για την ζωή των ασθενών. Όλες οι άλλες ύποπτες σοβαρές απροσδόκητες ανεπιθύμητες ενέργειες πρέπει να αναφέρονται στον ΕΟΦ (τμήμα Ανεπιθυμητών Ενεργειών) το αργότερο εντός 15 ημερών ,
- δ) μετά το πέρας της κλινικής μελέτης και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων να προσκομίσει στον ΕΟΦ (τμήμα Κλινικών Δοκιμών) τα τελικά συμπεράσματα.

#### Η ΠΡΟΪΣΤΑΜΕΝΗ ΤΗΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗΣ

Μιράντα Χ. Σιούτη MD, PhD

**Κοινοποίηση:**

α) Φαρ/κείο Νοσοκομείου

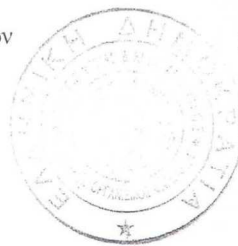
β) ΔΣ Νοσοκομείου

**των κάτωθι νοσοκομείων:**

1) Γεν. Νοσ. Αθηνών "Κοργιαλένιο- Μπενάκειο" ΕΕΣ, Αθανασάκη και Ερυθρού Σταυρού 1, 11526, Αθήνα.

**Εσωτερική Διανομή :**

1. Τμήμα Ελέγχου Εκτελωνισμών
2. Τμήμα Κλινικών Δοκιμών



ΘΕΩΡΟΥΝΤΕ ΟΤΙ ΤΗΝ ΑΚΡΙΒΕΙΑ  
ΤΗΣ ΠΡΑΞΗΣ ΕΠΙΣΤΕΥΟΝΤΕΣ  
ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑΣ

α α

ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗΣ ΑΕ  
Διοικητής

2

## **Christos Reppas**

---

**From:** "metzidaki" <metzidaki@eof.gr>  
**To:** <reppas@pharm.uoa.gr>  
**Sent:** Παρασκευή, 6 Φεβρουαρίου 2009 10:49 πμ  
**Subject:** eed

Η ΕΕΔ γνωματεύει ομόφωνα την έγκριση της κλινικής μελέτης ΕΕΔ 111 / 08, υπό την προϋπόθεση ότι: α) το Εντυπο συγκατάθεσης θα απλοποιηθεί και θα περιγράφει σαφώς όλες τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, β) το Ασφαλιστήριο συμβόλαιο θα τροποποιηθεί ως προς τη διατύπωση της πρώτης παραγράφου στις καλύψεις, γ) θα επεξηγηθεί γιατί ο χορηγός της μελέτης, η Φαρμακευτική Εταιρεία, Glaxo Smith Kline, δεν εμφανίζεται σε κανένα σημείο του Ασφαλιστηρίου συμβολαίου δ) στο Εντυπο συγκατάθεσης στο λήμμα Αποζημίωση να γραφούν τα σημεία 1,2 και 3 του κειμένου για την Αποζημίωση της κας Παπαδοπούλου το οποίο έχει υιοθετηθεί από την ΕΕΔ και ε) να κατατεθεί η προέγκριση του κλινικού πρωτοκόλλου από την τοπική Επιτροπή Δεοντολογίας ή την Επιστημονική Επιτροπή ή το ΔΣ του Νοσοκομείου στο οποίο θα διεξαχθεί η μελέτη σύμφωνα με την απόφαση με αρ. Πρωτ. Υ4α/οικ 88287 του Υπουργείου Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΓΥΗΣ  
ΕΘΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ  
Μεσογείων 284 , 155 62 Χολαργός

Πληροφορίες: Γεωργία Μετζιδάκη  
Τηλ 210 6507446  
e-mail:metzidaki@eof.gr

ΜΕ ΑΠΟΔΕΙΞΗ  
Αρ.Πρωτ.: 66930/ 16.10.08  
Αθήνα,

Προς φαρμακευτική εταιρεία/CRO:

Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας  
Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ  
Πανεπιστιμιούπολη, 157 71, Ζωγράφου

#### Γνωμάτευση ΕΕΔ αριθμός

ΘΕΜΑ : In vivo διερεύνηση της καθίζησης των ασθενών βάσεων στον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών

Αριθμός ΕυδραCT: 2008-006178-13

Η ΕΕΔ στην ...<sup>η</sup> Συνεδρίαση με ημερομηνία ... αφού μελέτησε τα στοιχεία του θέματος « In vivo διερεύνηση της καθίζησης των ασθενών βάσεων στον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών », και λαμβάνοντας υπόψη της την Υπουργική Απόφαση « Σύσταση και κανονισμός λειτουργίας της ΕΕΔ για Κλινικές Μελέτες » ( ΦΕΚ 1503, Τεύχος β, 7.10.2004 ) και την Υπουργική Απόφαση « Εναρμόνιση της Ελληνικής Νομοθεσίας », ΔΥΓ3/89292/30.12.2003 ( ΦΕΚ 1973, Τεύχος β, 31.12.2003 ) θεωρεί ότι η Κλινική Μελέτη με Κωδικό GR210181 τηρεί τις προϋποθέσεις Δεοντολογίας και γνωματεύει

#### Ομόφωνα

Την έγκριση διεξαγωγής της Κλινικής Μελέτης με κωδικό GR210181. Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής  
Χορηγός: ΕΚΠΑ.



#### Στοιχεία της Μελέτης

1. Κωδικός Μελέτης Ε.Ε.Δ: IS-111/01/08
  2. Χορηγός: ΕΚΤΠΑ
  3. Κωδικός Αριθμός, Έκδοση και Ημερομηνία του Πρωτοκόλλου: GR210181, 15 Ιουλίου 2008
  4. Έντυπο Συγκατάθεσης μετά από Ενημέρωση:
    - α) Ελληνική Έκδοση με ημερομηνία 06 Φεβρουαρίου 2009 (σύμφωνα και με τις υποδείξεις της ΕΕΔ)
  5. Κέντρα διεξαγωγής της Μελέτης και υπεύθυνος ερευνητής:  
Γαστρεντερολογικό Τμήμα, Νοσοκομείο Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού, Αθανασάκη και Ερυθρού Σταυρού 1, Αθήνα / Ιατρός, Γαστρεντερολόγος, PhD Κωνσταντίνος Γκούμας
  6. Υπεύθυνος Παρακολούθησης της Μελέτης: Χρήστος Ρέππας, Αν. Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστημιούπολη, 157 71 Ζωγράφου, 210 727 4678 / 6937 179 155, 210 727 4027
  7. Προβλεπόμενος αριθμός συμμετεχόντων: 12
  8. Λήξη Μελέτης: Νοέμβριος 2009
  9. Ασφαλιστήριο Συμβόλαιο: Το Ασφαλιστήριο συμβόλαιο οφείλει να καλύπτει όλους τους ασθενείς σε όλη τη διάρκεια της μελέτης από την έναρξη μέχρι και τη λήξη της.
  10. Ποσότητα φαρμάκων που θα χρησιμοποιηθεί στη μελέτη:
    - 1<sup>η</sup> Ημέρα: (100 + 300) mg Κετοκοναζόλης ανά εθελοντή. Συνολικά, για 12 υγιείς εθελοντές θα χρειαστούν 4.8 g Κετοκοναζόλης.
    - 2<sup>η</sup> Ημέρα: (30 + 90) mg Διπυριδαμόλης ανά εθελοντή. Συνολικά, για 12 υγιείς εθελοντές θα χρειαστούν 1.44 g Διπυριδαμόλης.
1. Όλες οι εργαστηριακές - απεικονιστικές εξετάσεις , οι οποίες διενεργούνται στα πλαίσια της έρευνας χωρίς να είναι απαραίτητες για την ενδεικνυόμενη παρακολούθηση του ασθενούς θα πρέπει να καλύπτονται από τον προϋπολογισμό του πρωτοκόλλου.
2. Καλύπτονται και ασφαρίζονται όλα τα σοβαρά ανεπιθύμητα συμβάντα / ενέργειες , ως η Υπουργική Απόφαση ΔΥΓ3/89292/31.12.2003, άρθρο ιε . Επιπλέον στη περίπτωση που προκύψει εγκυμοσύνη και το νεογνό εμφανίσει προβλήματα υγείας ( αναπηρίες κ.λπ ) οφειλόμενα στο υπό έρευνα φαρμακευτικό προϊόν , παρότι στο πρωτόκολλο και στο έντυπο συγκατάθεσης προβλέπεται ειδική λεπτομερής ενημέρωση για τους κινδύνους του υπό έρευνα φαρμακευτικού προϊόντος και την αποφυγή εγκυμοσύνης και παρότι το υποκείμενο της μελέτης έλαβε όλα τα ενδεικνυόμενα μέτρα αντισύλληψης καλύπτονται και ασφαρίζονται και αυτές .

Ο Πρόεδρος της ΕΕΔ

Ι. Παπαδημητρίου  
Καθηγητής Χειρουργικής

Κοινοποίηση: ΕΕΔ

Τμήμα Κλινικών Μελετών ΕΟΦ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΚΟΡΓΙΑΛΕΝΕΙΟ – ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ Ε.Ε.Σ.



**ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**  
**Δ/ΝΤΗΣ ΔΗΜ. ΣΟΥΤΟΣ**

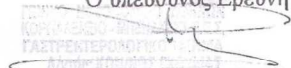
Τηλέφωνο: 210-6414724  
Fax: 210-6414635

**ΑΘΗΝΑ 12/11/2009**

**ΠΡΟΣ**

Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης  
Εθνική Επιτροπή Δεοντολογίας  
Μεσογείων 284, 155 62 Χολαργός

Θα θέλαμε να σας ενημερώσουμε ότι η μελέτη με θέμα «*In vivo* διερεύνηση της καθίζησης των ασθενών βάσεων στον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών» (Αριθμός EudraCT: 2008-006178-13 - Κωδικός μελέτης ΕΕΔ: IS 111/01/08) έχει ολοκληρωθεί.

Ο υπεύθυνος Ερευνητής  
  
Κωνσταντίνος Γκούμας

## **Παράρτημα 3**

**Έγγραφα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εθελοντή στη διάρκεια της κλινικής μελέτης**

**Ερωτήσεις προς τους υποψήφιους εθελοντές κατά τη διάρκεια της αρχικής συνέντευξης**

**Όνοματεπώνυμο:** \_\_\_\_\_

**Τηλέφωνο:** \_\_\_\_\_

**Ημερομηνία:**

## **ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ**

1. Είστε διαθέσιμος δύο διαφορετικά Σάββατα από το Νοέμβριο 2008 μέχρι το Μάρτιο 2009 (8:00 π.μ -2:00 μ.μ); Αν ναι, ποια Σάββατα δε θα μπορούσατε να προσέλθετε;
2. Έχετε ιατροφαρμακευτική ασφάλιση; Που;
3. Καπνίζετε; Πόσα τσιγάρα την ημέρα;
4. Είστε σε θέση να απέχετε από το κάπνισμα τουλάχιστον για 2 τριήμερα;
5. Είστε σε θέση να απέχετε από την κατανάλωση αλκοόλ τουλάχιστον για 2 τριήμερα;
6. Ποια είναι η ηλικία σας, ποιο είναι το βάρος και ποιο το ύψος σας;
7. Έχετε ή είχατε στο παρελθόν κάποιο γαστρεντερολογικό πρόβλημα;
8. Έχετε ή είχατε στο παρελθόν κάποιο χρόνια πρόβλημα υγείας; (π.χ. από το καρδιαγγειακό σύστημα, το θυρεοειδή, το πάγκρεας ή το ήπαρ;) Πως το αντιμετωπίσατε;
9. Τι φάρμακα έχετε καταναλώσει τις τελευταίες 30 μέρες;
10. Παίρνετε συνταγογραφούμενα φάρμακα;
11. Παίρνετε μη συνταγογραφούμενα φάρμακα; Ποια; Πόσο συχνά;
12. Παίρνετε αντιόξινα;

13. Είστε σε θέση να απέχετε από την κατανάλωση συνταγογραφούμενων και μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων τουλάχιστον για 2 τριήμερα;
14. Χρησιμοποιείτε αντισυλληπτικά χάπια; (αν ναι, πριν πόσο καιρό αρχίσατε τη χρήση αντισυλληπτικών)
15. Είστε έγκυος ή θηλάζετε;
16. Έχετε το ένζυμο G 6PD;
17. Είστε αποκλειστικά χορτοφάγος;
18. Έχετε πάρει πρόσφατα μέρος σε κάποια άλλη μελέτη που περιλαμβάνει φάρμακα;
19. Έχετε κανονικές εντερικές συνήθειες (δυσκοιλιότητα, διάρροια);
20. Κάνετε εύκολα /συχνά εμετό;
21. Αντιμετωπίζετε δυσκολίες στην κατάποση;
22. Είστε αλλεργικός σε κάτι;
23. Έχετε υποβληθεί σε κάποια σημαντική χειρουργική επέμβαση;

### **Ενημέρωση**

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

### **Παρατηρήσεις**

---

---

**Φυλλάδιο συγκατάθεσης, όπως διαμορφώθηκε τελικά μετά  
από τις υποδείξεις της Ε.Ε.Δ.**

**Αριθμός : GR210181**

Ημερομηνία : 6 Φεβρουαρίου 2009

*In vivo* διερεύνηση της καθίζησης φαρμάκων που είναι ασθενείς βάσεις στον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών

Δήλωση συγκατάθεσης εθελοντή για τη συμμετοχή του στη μελέτη

Ερευνητική Ομάδα

Κ. Γκούμας, M.D., Νοσοκομείο Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού, Αθήνα

Χ. Ρέππας, Ph.D., Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. Ψαχούλιας, MSc, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μ. Βερτζώνη, Ph.D., Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών



Καλείστε να συμμετάσχετε σε μια ερευνητική μελέτη. Πριν αποφασίσετε, είναι σημαντικό να κατανοήσετε το σκοπό της μελέτης, 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 πάρετε μέρος.

Ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης;

Ο σκοπός της μελέτης είναι να κατανοηθεί καλύτερα ο μηχανισμός απορρόφησης μιας κατηγορίας φαρμάκων (ασθενείς βάσεις) μετά από του στόματος χορήγηση. Ασθενείς βάσεις μπορεί να είναι φάρμακα που ανήκουν σε οποιαδήποτε θεραπευτική κατηγορία. Ο όρος «ασθενής βάση» υποδηλώνει χημικά χαρακτηριστικά και δεν έχει σχέση με φαρμακολογική δράση. Πληρέστερη κατανόηση της διαδικασίας απορρόφησης ενώσεων με ασθενώς βασικές (αλκαλικές) ιδιότητες θα βοηθήσει στην επιτάχυνση της διαδικασίας ανάπτυξης φαρμακολογικά δραστικών μορίων που έχουν ιδιότητες ασθενούς βάσης. Οι ασθενείς βάσεις αποτελούν περίπου το 40% των φαρμάκων.

Η μελέτη περιλαμβάνει τη συλλογή και ανάλυση των περιεχομένων της ανώτερης περιοχής του λεπτού εντέρου, δηλαδή της περιοχής που βρίσκεται αμέσως κάτω από το στομάχι σας. Τα περιεχόμενα αυτά θα αναλυθούν στο εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Παράλληλα, είναι πιθανό μερικά δείγματα να μεταφερθούν και να χρησιμοποιηθούν από τα συνεργαζόμενα με το εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής ερευνητικά εργαστήρια της Glaxo Smith Kline (GSK) στο Ηνωμένο Βασίλειο.

Το αναρροφημένο υλικό δε θα χρησιμοποιηθεί σε ανάλυση γενετικού υλικού.

Γιατί έχω επιλεγεί;

Ανταποκριθήκατε εθελοντικά σε μια διαφήμιση, σύμφωνα με την οποία ζητούνται υγιείς ενήλικες για τη συγκεκριμένη μελέτη. Μετά από μια σύντομη συνέντευξη, ώστε να διαπιστώσουμε, ότι είστε σε καλή κατάσταση και να εκτιμήσουμε το επίπεδο της υγείας σας, το ιατρικό ιστορικό σας και, αν είστε γυναίκα, τρέχουσα ή πρόσφατη

εγκυμοσύνη, εξεταστήκατε από Γαστρεντερολόγο, ο οποίος είναι υπεύθυνος για το κλινικό μέρος της μελέτης. Μετά από γενικές εξετάσεις αίματος (συμπεριλαμβανομένων εξετάσεων για ηπατίτιδα και HIV) αποφασίστηκε, ότι πληρείτε τα κριτήρια συμμετοχής στη μελέτη. Δεν υπάρχει κανένας άλλος λόγος, για τον οποίο έχετε επιλεγεί να συμμετάσχετε σε αυτήν τη μελέτη. Θα μελετήσουμε παρόμοιο υλικό (που θα συλλέξουμε από το πάνω μέρος του λεπτού εντέρου) από συνολικά 12 υγιείς εθελοντές.

Πρέπει να λάβω μέρος;

Εξαρτάται από εσάς, αν θα συμμετάσχετε ή όχι. Εάν αποφασίσετε να λάβετε μέρος, θα σας ζητηθεί να υπογράψετε την παρούσα δήλωση συγκατάθεσης. Εάν αποφασίσετε να λάβετε μέρος, στη συνέχεια είστε ελεύθερος/η να αποσυρθείτε οποιαδήποτε στιγμή χωρίς να δώσετε λόγο. Σε αυτήν την περίπτωση, το αναρροφημένο από σας δείγμα θα καταστραφεί.

Τι θα συμβεί, αν λάβω μέρος;

Πρέπει να επισκεφθείτε το Γαστρεντερολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου του Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού στην Αθήνα δυο διαφορετικές ημέρες. Η δεύτερη επίσκεψη θα απέχει χρονικά τουλάχιστο 2 εβδομάδες από την πρώτη. Κατά τη διάρκεια κάθε επίσκεψης θα μείνετε περίπου 5 ώρες στο Νοσοκομείο. Στην πρώτη επίσκεψη θα σας χορηγηθεί κετοκοναζόλη (ένα συνθετικό αντιμυκητιασικό φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται στη θεραπείες του δέρματος και στις μυκητιάσεις). Στη δεύτερη επίσκεψη θα σας χορηγηθεί διπυριδαμόλη (φάρμακο, το οποίο παρεμποδίζει το σχηματισμό θρόμβων, όταν χορηγείται χρονίως, και προστατευτικό των φλεβών, όταν αυτό χορηγείται σε υψηλές δόσεις για μικρό διάστημα). Τα δυο φάρμακα είναι εγκεκριμένα και κυκλοφορούν σε όλες τις χώρες του κόσμου. Οι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες της κετοκοναζόλης είναι ναυτία, εμετοί, κοιλιακά άλγη και κνησμός. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθούν κεφαλαλγία, ζάλη, υπνηλία, πυρετός με ρίγος, φωτοφοβία, διάρροια ή δυσκοιλιότητα και γυναιομαστία. Συχνά διαπιστώνεται αύξηση των τρανσαμινασών, που συνήθως υποχωρεί. Εν τούτοις, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις σοβαρής ηπατίτιδας, που μερικές φορές ήταν θανατηφόρα. Η ηπατική βλάβη μπορεί να εξελιχθεί και μετά τη διακοπή του

φαρμάκου (Εθνικό Συνταγολόγιο, ΕΟΦ, 2000). Οι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες της διπυριδαμόλης είναι κεφαλαλγία, ζάλη, ναυτία, ίλιγγοι, διάρροια και γαστρεντερικές διαταραχές, εξανθήματα και υπόταση, κυρίως μετά από ενδοφλέβια χορήγηση. Μπορεί να επιδεινώσει τη στηθάγχη (από υποκλοπή) και την ημικρανία (Εθνικό Συνταγολόγιο, ΕΟΦ, 2000).

Επίσκεψη, κατά την οποία χορηγείται κετοκοναζόλη

8:00 π.μ.: Ο εθελοντής φτάνει στο Νοσοκομείο. Από της 8:00 μ.μ. το προηγούμενο βράδυ ο εθελοντής απέχει από κάθε τροφή, αλλά μπορεί να πίνει νερό όπως επιθυμεί.

8:15 π.μ.: Εισαγωγή ενός καθετήρα που αποτελείται από δυο ανεξάρτητους σωλήνες μέσω της μύτης, στο στόμαχο, μέχρι το ανώτερο μέρος του λεπτού εντέρου (μέχρι 30 cm περίπου μέσα στο λεπτό έντερο). Η εισαγωγή πραγματοποιείται στο Ακτινολογικό Τμήμα του Ν.Ε.Ε.Σ. με ακτινολογικό έλεγχο από ειδικευμένο ακτινολόγο και υπό την εποπτεία του Γαστρεντερολόγου που είναι υπεύθυνος για το κλινικό μέρος της μελέτης.

9:00 π.μ.: Χορήγηση 80 mL νερού και ~30 mL διαλύματος κετοκοναζόλης (pH 2.5, συνολική ποσότητα κετοκοναζόλης 100 mg), και 80 mL νερού στο νηστικό στόμαχο. Όλα τα υγρά θα χορηγούνται το ένα μετά το άλλο μέσω του σωλήνα του καθετήρα που εκβάλλει στο στόμαχο.

9:00-10:00 π.μ.: Αναρροφούνται δείγματα από το δωδεκαδάκτυλο (μέσω του σωλήνα του καθετήρα, που εκβάλλει στο λεπτό έντερο). Τα δείγματα διηθούνται ή φυγοκεντρώνονται και φυλάσσονται μέχρι να αναλυθούν.

10:00 π.μ.: Χορήγηση 250 mL νερού μέσω του σωλήνα που εκβάλλει στο στόμαχο.

10:00 π.μ.- μεσημέρι: Ο εθελοντής χαλαρώνει, ώστε τα περιεχόμενα του ανώτερου τμήματος του γαστρεντερικού σωλήνα να απομακρύνουν τα υπολείμματα κετοκοναζόλης και, επίσης, τα επίπεδα κετοκοναζόλης στο αίμα να μειωθούν (μετά τη χορήγηση της δόσης των 100 mg – ο χρόνος που παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα μετά από απλή χορήγηση είναι 1-2h μετά τη χορήγηση. Επίσης, κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου ακτινοσκοπικά θα επιβεβαιωθεί η σωστή θέση του καθετήρα και αν απαιτείται θα γίνει μια μικρή αναπροσαρμογή της θέσης αυτού.

Μεσημέρι: Χορήγηση 80 mL νερού, και ~30 mL διαλύματος κετοκοναζόλης (pH 2.5, συνολική ποσότητα κετοκοναζόλης 300 mg), και 80 mL νερού στο νηστικό στόμαχο. Όλα τα υγρά θα χορηγούνται το ένα μετά το άλλο μέσω του σωλήνα που εκβάλλει στο στόμαχο.

Μεσημέρι-1:00 μ.μ.: Αναρροφούνται δείγματα από το δωδεκαδάκτυλο (μέσω του σωλήνα του καθετήρα που εκβάλλει στο λετό έντερο). Τα δείγματα διηθούνται ή φυγοκεντρώνονται και φυλάσσονται μέχρι να αναλυθούν.

1:00 μ.μ.: Γίνεται ο τελικός ακτινολογικός έλεγχος, ώστε να επιβεβαιωθεί, ότι ο καθετήρας έμεινε στη σωστή θέση καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο γαστρεντερολόγος αφαιρεί καθετήρα και ο εθελοντής μετά από μια σύντομη εξέταση από το γαστρεντερολόγο θα λάβει ένα ελαφρύ γεύμα. Στη συνέχεια, ο εθελοντής θα είναι ελεύθερος να φύγει.

Επισημαίνεται ότι η συνιστώμενη ημερήσια δόση της κετοκοναζόλης είναι 200-400 mg χορηγούμενη ως εφ' άπαξ δόση.

Επίσκεψη, κατά την οποία χορηγείται διπυριδαμόλη

Όμοια με τη μελέτη κετοκοναζόλης, αλλά οι δυο δόσεις, που θα χορηγηθούν, θα είναι 30 και 90 mg, αντίστοιχα. Παρακαλώ, σημειώστε, ότι ο χρόνος που παρατηρείται η

μέγιστη συγκέντρωση διπυριδαμόλης στο αίμα μετά από απλή χορήγηση είναι ~75 min μετά τη χορήγηση. Σημειώνεται ότι η συνιστώμενη δόση της διπυριδαμόλης είναι 75-100 mg, τέσσερις φορές την ημέρα.

Γενικές πληροφορίες που σχετίζονται και με τις δυο επισκέψεις

Η εισαγωγή και η παραμονή του καθετήρα μέχρι και 5 ώρες μέσα στον ανώτερο γαστρεντερολογικό σωλήνα δεν προκαλεί τραυματισμούς, αλλά προκαλεί ένα αίσθημα δυσφορίας. Προηγούμενη εμπειρία δείχνει, ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος και μεταξύ των δειγματοληψιών οι εθελοντές κάθονται και διαβάζουν και/ή παρακολουθούν τηλεόραση. Συνήθως, η περιοχή του οισοφάγου ψεκάζεται περιοδικά με ένα τοπικό αναισθητικό, ώστε να μειωθεί το αίσθημα δυσφορίας.

Κατά την παραμονή σας στο Νοσοκομείο και κατά την απίθανη περίπτωση μιας ανεπιθύμητης δράσης σχετιζόμενης με τη χορήγηση των φαρμάκων ή με την εισαγωγή του καθετήρα, θα σας προσφερθούν οι πρώτες βοήθειες και ανάλογη θεραπεία. Σύμφωνα με το νόμο είστε ασφαλισμένος για οποιοδήποτε ιατρικό πρόβλημα παρουσιαστεί, με την προϋπόθεση, ότι σχετίζεται με τις επεμβάσεις (εισαγωγή καθετήρα και χορήγηση φαρμάκου) που γίνονται στα πλαίσια της συμμετοχής σας στη συγκεκριμένη μελέτη. Αν δεν ισχύει η προϋπόθεση αυτή καμιά αξίωση δεν μπορεί να γίνει αποδεκτή. Ο γαστρεντερολόγος είναι επίσης ασφαλισμένος για την αστική ευθύνη που μπορεί να υπάρξει κατά τη διάρκεια της συμμετοχής του στη μελέτη. Αξίζει να αναφερθεί, παρόλα αυτά, ότι τόσο ο γαστρεντερολόγος, όσο και ο ακτινολόγος, έχουν μεγάλη εμπειρία με αντίστοιχες τεχνικές και μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί κάτι αναπάντεχο σε παρόμοιες μελέτες.

Μετά την ολοκλήρωση των δυο επισκέψεων θα σας δοθεί το ποσό των 500 Ευρώ, τόσο για το χρόνο σας, όσο και για τη θέληση σας να περάσετε τις παραπάνω διαδικασίες. Η πληρωμή θα γίνει μέσω του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και υπόκειται σε φόρους. Σε περίπτωση που δεν ολοκληρώσετε τις δυο επισκέψεις για λόγους που δεν ευθύνεστε θα πληρωθείτε στο

ακέραιο. Σε περίπτωση που δεν ολοκληρώσετε τις δυο επισκέψεις για λόγους που ευθύνεστε δε θα πληρωθείτε.

### **Αποζημίωση**

1) Το ΕΚΠΑ ευθύνεται για κάθε άμεση ή έμμεση ζημία που θα προκληθεί στο συμμετέχοντα από τη χορήγηση του φαρμάκου ή από οποιαδήποτε κλινική παρέμβαση ή διαδικασία στο πλαίσιο της συμμετοχής του στη μελέτη η οποία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί, αν ο συμμετέχων δεν είχε λάβει μέρος στη μελέτη.

Το ΕΚΠΑ απαλλάσσεται από την ανωτέρω ευθύνη, αν η ζημία οφείλεται αποκλειστικά σε οποιοδήποτε πταίσμα του συμμετέχοντος ή τη μη τήρηση των οδηγιών που του δόθηκαν.

2) Για κάθε αξίωση του συμμετέχοντα στην πιο πάνω κλινική δοκιμή κατά οποιουδήποτε υπευθύνου αρμόδια είναι τα ελληνικά δικαστήρια.

3) Ο συμμετέχων στη μελέτη εκχωρεί από τώρα τις αξιώσεις του κατά των κατά τα ανωτέρω υπευθύνων, στον ασφαλιστικό του οργανισμό, αν αυτός ο ασφαλιστικός οργανισμός επιβαρυνθεί οικονομικά από τη συμμετοχή του ασφαλισμένου στην πιο πάνω μελέτη (ενδεικτικά και όχι αποκλειστικά αν ο ασφαλιστικός οργανισμός επιβαρυνθεί με εξετάσεις για την κλινική μελέτη που δεν θα γίνονται αλλιώς, την αξία του χορηγούμενου φαρμάκου, τη νοσηλεία από επιπλοκές εξαιτίας της κλινικής δοκιμής κλπ.).

Ποια είναι τα πιθανά οφέλη από τη συμμετοχή σας;

Δεν πρόκειται να έχετε κάποιο προσωπικό όφελος από τη συμμετοχή σας στην έρευνα. Οι ερευνητές και η εταιρεία θα έχουν αποκλειστική ιδιοκτησία των αποτελεσμάτων της έρευνας, καθώς και οποιαδήποτε χρήσης ή ανάπτυξης από τα αρχεία της έρευνας (συμπεριλαμβανομένου του δείγματός σας), που θα είναι

συνέπεια αυτής της συγκατάθεσης. Με τη συμφωνία για χρήση του υλικού σας για ερευνητικούς λόγους, συμφωνείτε, ότι τόσο το ερευνητικό κέντρο, όσο και η GSK, μπορούν να αιτηθούν και να χρησιμοποιήσουν πατέντες σχετιζόμενες με τα αποτελέσματα της έρευνας, τα αρχεία ή τις ανακαλύψεις και καμιά αμοιβή δε θα σας δοθεί. Όταν θα έχουμε εξετάσει υλικό από ένα σημαντικό αριθμό εθελοντών, ελπίζουμε να συνδυάσουμε όσο το δυνατό περισσότερα δεδομένα και να δημοσιοποιήσουμε τα αποτελέσματα. Σε αυτήν την περίπτωση, τα αποτελέσματα της έρευνας θα γίνουν διαθέσιμα στην ιατρική και επιστημονική κοινότητα.

Η συμμετοχή μου στην έρευνα θα παραμείνει μυστική;

Όλες οι πληροφορίες, οι οποίες θα συλλεχθούν σχετικά με εσάς κατά τη διάρκεια του ερευνητικού προγράμματος, θα παραμείνουν αυστηρά εμπιστευτικά. Κάθε πληροφορία σχετικά με εσάς, η οποία θα φεύγει από το Νοσοκομείο, δε θα φέρει το όνομα και τη διεύθυνσή σας, έτσι ώστε να μην μπορείτε να αναγνωριστείτε από αυτά. Για προστασία της ανωνυμίας σας, το δείγμα σας και κάθε ιατρικό στοιχείο το οποίο μεταφέρεται στα εργαστήριά μας, θα φέρει ετικέτα (ή κωδικό) μόνο με έναν αριθμό εθελοντή και όχι με το όνομά σας. Μόνο ο κλινικός υπεύθυνος της μελέτης και οι υφιστάμενοί του στο Νοσοκομείο θα έχουν αντιστοιχία του αριθμού με το όνομά σας.

Τι θα γίνουν τα αποτελέσματα της έρευνας;

Στόχος είναι, τα δεδομένα να συνδυαστούν με αυτά, τα οποία παρατηρήθηκαν με τη χρήση του υλικού από τους υπόλοιπους 11 εθελοντές. Ελπίζουμε να δημοσιεύσουμε τα αποτελέσματα, έτσι ώστε όσο το δυνατόν περισσότερα ευρήματα να γίνουν διαθέσιμα στην ιατρική και επιστημονική κοινότητα. Δε θα μπορείτε να αναγνωριστείτε σε καμιά δημοσίευση. Λόγω της ερευνητικής φύσης της εργασίας, κανένα από τα αποτελέσματα δε θα δοθούν σε εσάς ή στους μελλοντικούς θεραπευτές

σας. Η χρονική στιγμή της δημοσίευσης εξαρτάται, κυρίως, από την ταχύτητα συλλογής των δεδομένων και δεν μπορεί να προβλεφθεί με σιγουριά.

Ποιος οργανώνει και χρηματοδοτεί την έρευνα;

Είναι ένα συνδυασμένο πρόγραμμα των ερευνητικών εργαστηρίων μεταξύ των ιατρών του Νοσοκομείου του Ερυθρού Σταυρού Αθηνών και των ερευνητών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Χρηματοδοτείται αποκλειστικά από τη Glaxo Smith Kline (UK). Η ερευνητική ομάδα δεν πληρώνεται για να σας συμπεριλάβει στη μελέτη.

Ποιος ελέγχει τη μελέτη;

Πριν αρχίσει κάθε έρευνα, πρέπει να εγκριθεί από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (ΕΟΦ).

### **Περισσότερες πληροφορίες**

Δρ. Χρ. Ρέππας (Αναπληρωτής Καθηγητής στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών) Τηλέφωνο: 210 727 4678 ή 6937 179 155

Δρ. Κ. Γκούμας (Κλινικός υπεύθυνος της μελέτης) Τηλέφωνο: 6932 606 605



## **ΦΥΛΛΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ**

1. Διαβεβαιώνω, ότι έχω διαβάσει και κατανοήσει πλήρως τις πληροφορίες, καθώς και τους όρους σχετικά με τη συμμετοχή μου στη συγκεκριμένη μελέτη όπως αυτά διατυπώνονται στις σελίδες 1-8 του παρόντος κειμένου και είχα την ευκαιρία να κάνω ερωτήσεις.

2. Κατανοώ, ότι η συμμετοχή μου είναι εθελοντική και είμαι ελεύθερος να εγκαταλείψω όποια χρονική στιγμή επιθυμώ, χωρίς να αναφέρω το λόγο και χωρίς να επηρεαστούν η ιατρική φροντίδα μου ή τα νομικά δικαιώματά μου.

3. Κατανοώ τις παραγράφους, στις οποίες αναφέρεται ή υπονοείται, ότι το ιατρικό ιστορικό μου θα γίνει γνωστό στην ερευνητική ομάδα. Έχω διαβεβαιωθεί, ότι όλα τα σχετιζόμενα με το πρόσωπό μου δεδομένα θα χρησιμοποιηθούν με απόλυτη μυστικότητα καθόλη τη διάρκεια της μελέτης και δε θα δημοσιοποιηθούν. Εξουσιοδοτώ την ερευνητική ομάδα, ώστε να έχουν πρόσβαση στα αρχεία μου.

4. Συμφωνώ να λάβω μέρος στη μελέτη

5. Κατανοώ ότι το παρόν έγγραφο υπογράφεται εις τριπλούν. Ένα έγγραφο θα δοθεί στον εθελοντή, ένα έγγραφο θα κρατηθεί από τον κλινικό υπεύθυνο της μελέτης, και ένα έγγραφο θα κρατηθεί στο αρχείο του Νοσοκομείου.

6. Δηλώνω υπεύθυνα, ότι δεν υπάρχει πιθανότητα εγκυμοσύνης.

Όνοματεπώνυμο εθελοντή

Υπογραφή & Ημερομηνία

Όνοματεπώνυμο του μέλους της  
ερευνητικής ομάδας στον οποίο δόθηκε η  
συγκατάθεση (εάν είναι διαφορετικό από  
τον κλινικό υπεύθυνο)

Υπογραφή & Ημερομηνία

Όνοματεπώνυμο του κλινικού υπεύθυνου  
της μελέτης

Υπογραφή & Ημερομηνία

**Ερωτήσεις προς τους εθελοντές το πρωί κάθε  
πειραματικής ημέρας πριν από τη χορήγηση**

### **Τίτλος Μελέτης**

In vivo διερεύνηση της καθίζησης φαρμάκων που είναι ασθενείς βάσεις στον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών

**Όνοματεπώνυμο 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**

-----

-----

## **Παράρτημα 4**

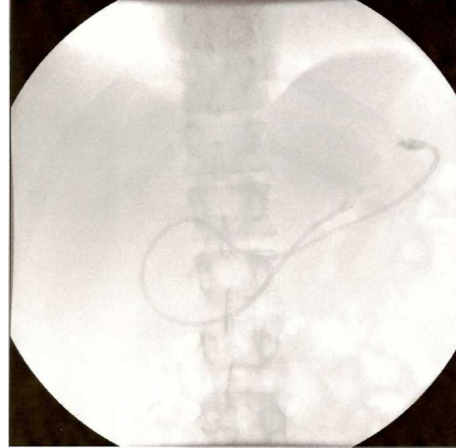
**Αντίγραφα ακτινοσκοπικών απεικονίσεων που ελήφθησαν στο τέλος κάθε πειραματικής ημέρας για επιβεβαίωση της θέσης του σωλήνα**

## Εθελοντής #1

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)



## Εθελοντής #2

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)



### Εθελοντής #3

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)



### Εθελοντής #4

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)



## Εθελοντής #5

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)

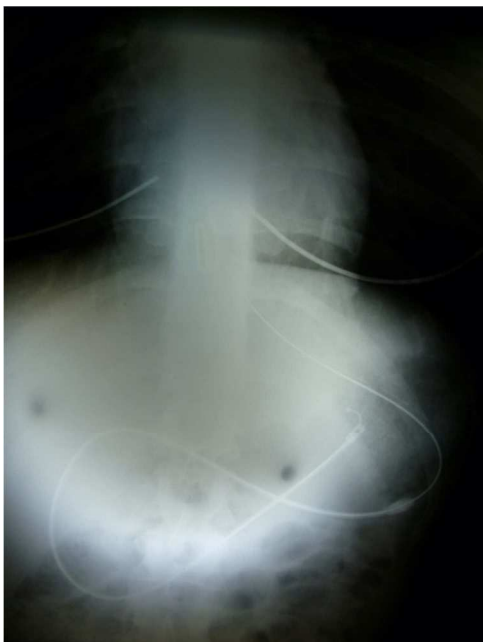


Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)



## Εθελοντής #6

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)





## Εθελοντής #7

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)



## Εθελοντής #8

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)

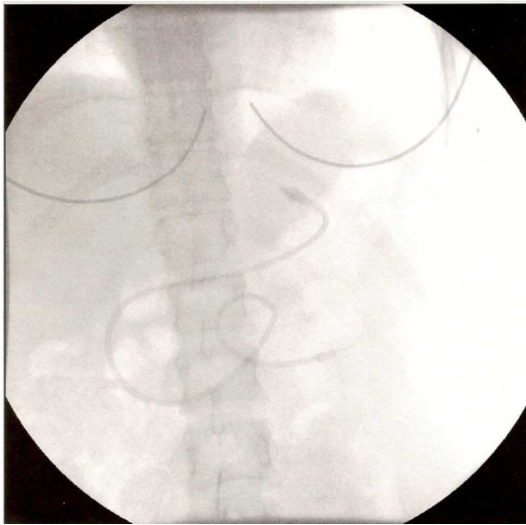


Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)

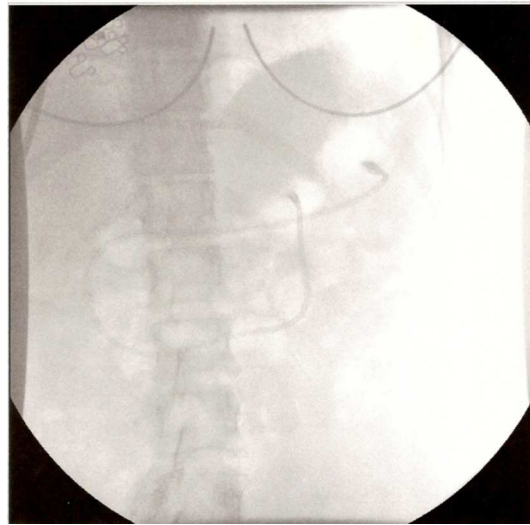


## Εθελοντής #9

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)

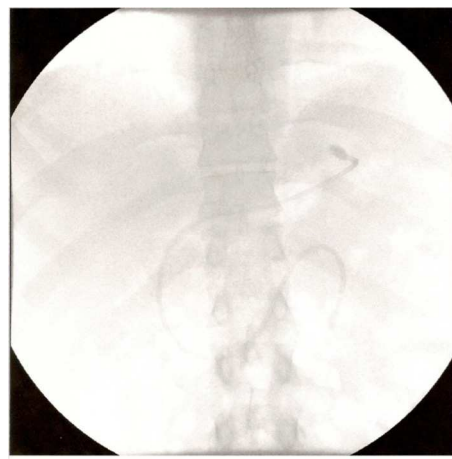


## Εθελοντής #10

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)



## Εθελοντής #11

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)

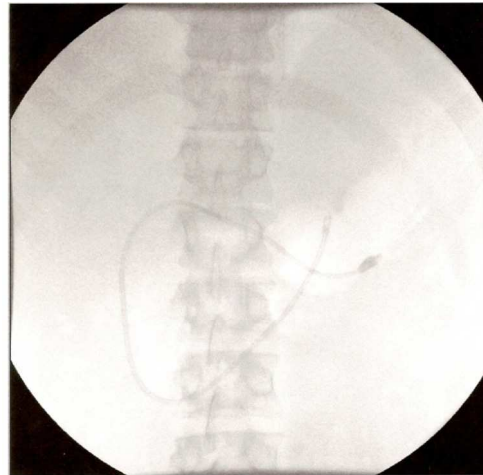


## Εθελοντής #12

Τέλος πειραματικής ημέρας A (DPD)



Τέλος πειραματικής ημέρας B (KCZ)



## Παράρτημα 5

### Βελτιστοποίηση της διαδικασίας του χειρισμού των αναρροφηθέντων δειγμάτων

Το pH των περιεχομένων του εντερικού αυλού κατά τη διαπεπτική περίοδο μπορεί να μεταβληθεί κατά την κατεργασία του δείγματος λόγω της καταστροφής των όξινων ανθρακικών ιόντων (Kalantzi et al. 2006a).

Κατά τη φυγοκέντρηση των αναρροφηθέντων δειγμάτων η τιμή pH έπρεπε να παραμείνει σταθερή. Για αυτόν το λόγο, ελέγχθηκε αν ένα μείγμα αντιβιοτικού και συντηρητικού (αναστολέας βακτηριδίων) ή αν το σφράγισμα ή όχι του σωλήνα με ελαστική μεμβράνη θα εμπόδιζε τη μεταβολή του pH των αναρροφηθέντων δειγμάτων κατά τη διάρκεια του χειρισμού τους. Το μείγμα αντιβιοτικού και συντηρητικού, που εξετάστηκε, αποτελούνταν από 10 % w/v χλωραμφαινικόλης και 8 % w/v NaN<sub>3</sub> και η συγκέντρωσή του στο αναρροφηθέν δείγμα ήταν 5 μL/mL (Hernell et al. 1990). Στον εθελοντή #1 κατά τη διαπεπτική περίοδο χορηγήθηκε DPD-L και αναρροφήθηκαν δείγματα εντερικού υγρού. Στο μισό όγκο κάθε δείγματος προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα του αναστολέα βακτηριδίων και μετά από ανακίνηση φυγοκεντρήθηκε χωρίς να σκεπαστεί ο σωλήνας, ενώ το υπόλοιπο δείγμα φυγοκεντρήθηκε χωρίς προσθήκη του αναστολέα και χωρίς να σκεπαστεί ο σωλήνας. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε το pH πριν από και μετά τη φυγοκέντρηση και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα Π5.1. Στη συνέχεια, και μετά την πάροδο 2 ωρών από το τέλος της πρώτης φάσης του πειράματος, χορηγήθηκε στον ίδιο εθελοντή DPD-H και τα αναρροφηθέντα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, αφού πρώτα ο δοκιμαστικός σωλήνας σφραγίστηκε με ελαστική μεμβράνη. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε το pH πριν από και μετά τη φυγοκέντρηση και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα Π5.2.

**Πίνακας Π5.1:** Τιμές pH των αναρροφηθέντων μετά τη χορήγηση του DPD-L δειγμάτων χωρίς και μετά την προσθήκη του αναστολέα βακτηριδίων και οι αντίστοιχες τιμές τους μετά τη φυγοκέντρωση \*

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος		pH αναρροφηθέντος δείγματος μετά τη φυγοκέντρωση	
	Χωρίς αναστολέα βακτηριδίων	Με αναστολέα βακτηριδίων	Χωρίς αναστολέα βακτηριδίων	Με αναστολέα βακτηριδίων
<b>5</b>	6,74	6,89	7,29	7,49
<b>10</b>	5,65	5,97	6,37	6,55
<b>20</b>	2,67	4,56	2,67	4,87
<b>30</b>	6,23	6,52	7,08	7,27
<b>40</b>	5,98	6,40	6,27	6,65
<b>50</b>	6,59	6,91	7,02	7,47
<b>60</b>	6,70	Μη διαθέσιμη τιμή	7,03	Μη διαθέσιμη τιμή
<b>70</b>	4,54	4,92	4,56	5,19

\* Όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν χωρίς να σκεπαστούν οι δοκιμαστικοί σωλήνες, στους οποίους περιέχονταν.

**Πίνακας Π5.2:** Τιμές pH των αναρροφηθέντων μετά τη χορήγηση του DPD-H δειγμάτων και οι αντίστοιχες τιμές τους μετά τη φυγοκέντρωση, αφού προηγουμένως οι δοκιμαστικοί σωλήνες είχαν σκεπαστεί με ελαστική μεμβράνη.

<b>Χρόνος αναρρόφησης (min)</b>	<b>pH αναρροφηθέντος δείγματος</b>	<b>pH αναρροφηθέντος δείγματος μετά τη φυγοκέντρωση</b>
<b>5</b>	5,75	5,80
<b>10</b>	5,16	5,17
<b>20</b>	4,72	4,71
<b>30</b>	6,18	6,34
<b>40</b>	6,60	6,69
<b>50</b>	7,03	7,48
<b>60</b>	5,93	5,97
<b>70</b>	4,38	4,38

Με βάση τα δεδομένα των Πινάκων Π5.1 και Π5.2 αποφασίστηκε, ότι όλα τα αναρροφηθέντα δείγματα θα σφραγίζονται με ελαστική μεμβράνη αμέσως μετά τη λήψη τους.

## Παράρτημα 6

### Επάρκεια φυγοκέντρησης για το διαχωρισμό στερεών σωματιδίων από περιεχόμενα του εντερικού αυλού που συλλέχθηκαν κατά τη διαπεπτική περίοδο

Η επάρκεια της φυγοκέντρησης (37 °C, 12560 × g, 10 min) σε σχέση με τη διήθηση μέσω ηθμών PVDF (0,45 μm) και ηθμών νιτρικής κυτταρίνης (0,45 μm) στο διαχωρισμό των στερεών από το διάλυμα μελετήθηκε με προκαταρκτικά πειράματα διαλυτότητας DPD και KCZ με τη χρήση εντερικού υγρού σκύλων, το οποίο συλλέχθηκε, όπως περιγράφεται από τους Kalantzi et al. (2006b). Οι διηθήσεις περιελάμβαναν τη χρήση υάλινων συρίγγων και ανοξειδωτων, ατσάλινων στηριγμάτων ηθμών. Και για τις δυο δραστικές ουσίες, κατά τη διήθηση χρειάστηκε να εφαρμοστεί πάρα πολύ μεγάλη πίεση.

Η προσρόφηση της DPD από τους ηθμούς PVDF ήταν σημαντική και υψηλής μεταβλητότητας (2,5-37 %). Παράλληλα, στην περίπτωση της DPD, ο συντελεστής μεταβλητότητας των δεδομένων διαλυτότητας ήταν 8,2 %, όταν για τη διήθηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ηθμοί PVDF, και 0,9 % όταν χρησιμοποιήθηκε η φυγοκέντρηση ως μέθοδος διαχωρισμού των στερεών από το διάλυμα.

Για την KCZ, η προσρόφηση από τους ηθμούς PVDF ήταν 4,5-31 % και τους ηθμούς νιτρικής κυτταρίνης 39-97 %. Σε πειράματα διαλυτότητας KCZ σε υγρό παχέος εντέρου, έχει αναφερθεί, ότι η φυγοκέντρηση οδηγεί σε μικρότερες τιμές συντελεστή μεταβλητότητας σε σχέση με τη διήθηση (Vertzoni et al. 2010).

Με βάση αυτά τα δεδομένα θεωρήθηκε ότι η φυγοκέντρηση στις συνθήκες που αναφέρθηκαν, είναι επαρκής για το διαχωρισμό στερεών σωματιδίων από περιεχόμενα του εντερικού αυλού, που συλλέχθηκαν κατά τη διαπεπτική περίοδο.

## Παράρτημα 7

Προκαταρκτικά πειράματα για τη βελτιστοποίηση του χειρισμού των δειγμάτων που συλλέγονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα και της *in vitro* διάταξης

*Π7.1 Διήθηση vs. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων, που συλλέγονται από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα*

Μετά την επώαση (48h/37°C) περίσσειας σκόνης της δραστικής ουσίας σε FaSSIF-V2 (DPD και KCZ) και σε FaSSIF-V2plus (AZD και SB), τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (37 °C, 12560 × g, 10 min). Ένα μέρος του υπερκειμένου αναλύθηκε, για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας, που περιέχεται σε αυτό. Το άλλο μέρος του υπερκειμένου διηθήθηκε μέσω ηθμού RC 0,45 μm (AZD, DPD και KCZ) και μέσω ηθμού PTFE 0,45 μm (SB) και το διήθημα αναλύθηκε, για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας σε αυτό. Στον Πίνακα Π4.1 παρουσιάζεται η μέση(τυπική απόκλιση) θερμοδυναμική διαλυτότητα κάθε δραστικής ουσίας, μετά από φυγοκέντρηση, και μετά από φυγοκέντρηση και διήθηση, και η % διαφορά τους.



**Πίνακας Π7.1:** Μέση(Τυπική απόκλιση) [n=3] θερμοδυναμική διαλυτότητα κάθε δραστικής ουσίας σε FaSSIF-V2 (DPD και KCZ) και σε FaSSIF-V2plus (AZD και SB), όπως αυτή μετρήθηκε μετά από φυγοκέντρηση, και μετά από φυγοκέντρηση και διήθηση των δεογμάτων, και η % διαφορά τους.

Δραστική ουσία	Μέση(Τυπική απόκλιση) θερμοδυναμική διαλυτότητα (μg/mL)		% Διαφορά
	Φυγοκέντρηση	Διήθηση	
AZD	10,7(1,3)	8,740(0,097)	22
DPD*	31,74	12,91	146
KCZ	16,9(1,1)	14,75(0,90)	15
SB	1,248(0,026)	0,950(0,035)	31

\* n=1

Επειδή δεν έχει παρατηρηθεί προσρόφηση των DPD, KCZ (Vertzoni et al. 2007) στους RC ηθμούς (0,45 μm) και η προσρόφηση του AZD στους RC ηθμούς (0,45 μm) [Παράρτημα 8] και η προσρόφηση του SB στους PTFE ηθμούς (0,45 μm) [Παράρτημα 9] ήταν μηδαμινή, συνεπάγεται, ότι η διήθηση ήταν επαρκέστερη της φυγοκέντρησης στο διαχωρισμό του στερεού από το διάλυμα και η διήθηση χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος διαχωρισμού στερεού από το διάλυμα σε όλα τα *in vitro* πειράματα.

#### *Π7.2 Προκαταρκτικά πειράματα για την εύρεση καταλληλότερου όγκου και τύπου ανακίνησης περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος*

Σε αυτά τα πειράματα, οι ρυθμοί ροής ήταν 6,25 mL/min για το χρονικό διάστημα 0-30 min (στο γαστρικό διαμέρισμα στα 30 min παρέμειναν 62,5 mL), 1,56 mL/min για το χρονικό διάστημα 60 min (στο γαστρικό διαμέρισμα στα 60 min παρέμειναν 18,7 mL) και 0,52 mL/min για το χρονικό διάστημα 60-90 min (στο γαστρικό διαμέρισμα στα 90 min παρέμειναν 3,1 mL). Ο καταλληλότερος όγκος των περιεχομένων στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα αποφασίστηκε συγκρίνοντας τα

ενδοαυτικά δεδομένα της κλινικής μελέτης μετά τη χορήγηση DPD-H με τα *in vitro* δεδομένα, τα οποία συλλέχτηκαν κατά την κένωση του DPD-H από το γαστρικό διαμέρισμα σε 50 mL ή 60 mL FaSSIF-V2plus. Στα 10 min μετά την έναρξη του *in vitro* πειράματος, τα κλάσματα καθίζησης ήταν 0,16 και 0,09, αντίστοιχα. Επειδή, το κλάσμα καθίζησης στα εντερικά υρά των υγιών ενηλίκων 10 min μετά τη χορήγηση DPD-H προσδιορίστηκε 0,02, αποφασίστηκε, ότι ο συγκριτικά καταλληλότερος όγκος των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος είναι 60 mL. Χρησιμοποιώντας 60 mL FaSSIF-V2plus στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα αξιολογήθηκε η επίδραση του τύπου της ανάδευσης στην καθίζηση της διπυριδαμόλης. Δεδομένα, που συλλέχτηκαν μετά τη χορήγηση του DPD-H κατά τη διάρκεια της *in vivo* μελέτης, συγκρίθηκαν με *in vitro* δοδομένα διπυριδαμόλης, τα οποία συλλέχτηκαν με τη χρήση του περυγίου (200 rpm, Σχήμα B.1) και με τη χρήση οριζόντιου ανακινητή, πάνω στον οποίο το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα ανακινιόταν καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. 40 min και 60 min μετά την έναρξη του πειράματος, τα κλάσματα καθίζησης ήταν 0,22 και 0,33, αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε το περιστρεφόμενο περύγιο. Οι αντίστοιχες τιμές με τον οριζόντιο ανακινητή ήταν 0,31 και 0,58, αντίστοιχα. Το κλάσμα καθίζησης στο εντερικό υγρό υγιών εθελοντών 40 min και 60 min μετά τη χορήγηση του DPD-H ήταν  $0,018 \pm 0,050$  και  $0,034 \pm 0,039$ , αντίστοιχα. Αποφασίστηκε, ότι το περιστρεφόμενο περύγιο είναι καλύτερο για ανάδευση των περιεχομένων του δωδεκαδακτυλικού διαμερίσματος. Πρόσφατα, προτάθηκε, ότι η οριζόντια ανακίνηση (85 strokes/min) μειώνει την καθίζηση (Carlert et al. 2010), αλλά στη σχετική εργασία έχουν χρησιμοποιηθεί εντελώς διαφορετικές υδροδυναμικές συνθήκες (κλειστό σύστημα για την αξιολόγηση στην καθίζηση).

Είναι προφανές ότι τα προκαταρκτικά πειράματα βοήθησαν στην κατανόηση ποικίλων ζητημάτων, τα οποία είχαν σχέση με τις *in vitro* συνθήκες, αλλά τα *in vitro* δεδομένα υπερεκτιμούν την ενδοαυτική καθίζηση.

Τέλος, η καταλληλότητα της ταχύτητας περιστροφής στα 200 rpm έναντι των 50 rpm στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Κεφ. B.6.3 και τοποθετώντας DPD-H στο γαστρικό διαμέρισμα και συγκρίνοντας τα δεδομένα με τα ενδοαυτικά δεδομένα μετά τη χορήγηση DPD-H. Κατά τη διάρκεια του πρώτου χρονικού διαστήματος 0-15 min, δηλ. 7,5 min μετά την έναρξη της κένωσης του DPD-H σε 60 mL

FaSSIF-V2plus, τα κλάσματα καθίζησης ήταν 0,07 στα 200 rpm και 0,17 στα 50 rpm. Με βάση τα ενδοαυλικά δεδομένα, μόνο η τιμή, που μετρήθηκε στα 200 rpm ήταν όμοια με τις ενδοαυλικές τιμές, που παρατηρήθηκαν στα 5 και 10 min μετά τη χορήγηση της δόσης.

## Παράρτημα 8

Έλεγχος προσρόφησης της δραστικής ουσίας AZD στους πλαστικούς περιέκτες και στους ηθμούς RC 0,45 μm και έλεγχος σταθερότητάς της σε FaSSIF-V2plus

**Πίνακας Π8.1:** % προσρόφηση της δραστικής ουσίας AZD στους πλαστικούς περιέκτες. \*

Δείγμα	Συγκέντρωση [t=0 h] (μg/mL)	Συγκέντρωση [t=48 h] (μg/mL)	% Απόκλιση μετά από 48 h
#1	8,7	4,7	-46
#2		7,1	-18
#3		7,0	-20

\* Επώαση (48 h, 37 °C, 75 oscillations/min) σε FaSSIF-V2plus και σε πλαστικούς περιέκτες. Η μέτρηση της συγκέντρωσης σε χρόνο t=0 έγινε μετά τη συνένωση 3 διηθημάτων που συλλέχθηκαν μετά από πείραμα διαλυτότητας (48 h, 37 °C, 75 oscillations/min) σε FaSSIF-V2plus.

**Πίνακας Π8.2:** % προσρόφηση της δραστικής ουσίας AZD στους ηθμούς RC 0,45 μm.\*

Δείγμα	1 <sup>η</sup> Διήθηση (μg/mL)	2 <sup>η</sup> Διήθηση (μg/mL)	% Προσρόφηση
#1	8,7	8,6	1,2
#2	8,7	8,5	1,6
#3	8,6	8,5	1,3

\* Τα δείγματα προέρχονται από πειράματα διαλυτότητας (48 h, 37 °C, 75 oscillations/min) σε FaSSIF-V2plus. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υάλινους περιέκτες και για τη διήθηση χρησιμοποιήθηκαν υάλινες σύριγγες.

**Πίνακας Π8.3:** Σταθερότητα της δραστικής ουσίας AZD σε FaSSIF-V2plus στους 37 °C.\*

Δείγμα	Συγκέντρωση [t=0 h] (μg/mL)	Συγκέντρωση [t=48 h] (μg/mL)	% Απόκλιση μετά από 48 h
#1	8,74	8,62	-1,36
#2		8,82	0,96
#3		8,90	1,84

\* Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υάλινους περιέκτες και για τη διήθηση χρησιμοποιήθηκαν υάλινες σύριγγες. Η μέτρηση της συγκέντρωσης σε χρόνο t=0 έγινε μετά τη συνένωση 3 διηθημάτων που συλλέχθηκαν μετά από πείραμα διαλυτότητας (48 h, 37 °C, 75 oscillations/min) σε FaSSIF-V2plus.

## Παράρτημα 9

Έλεγχος προσρόφησης της δραστικής ουσίας SB στους ηθμούς RC 0,45 μm και PTFE 0,45 μm και έλεγχος σταθερότητάς της σε FaSSIF-V2plus

**Πίνακας Π9.1:** Σταθερότητα της δραστικής ουσίας SB σε FaSSIF-V2plus στους 37 °C.\*

Δείγμα	Συγκέντρωση [t=0 h] (μg/mL)	Συγκέντρωση [t=48 h] (μg/mL)	% Απόκλιση μετά από 48 h
#1	1,23	1,17	-5,22
#2	1,17	1,10	-5,69
#3	1,22	1,15	-5,56

\* Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υάλινους περιέκτες και για τη διήθηση χρησιμοποιήθηκαν υάλινες σύριγγες. Οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων σε χρόνο t=0 προέρχονται από δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν μετά από πείραμα διαλυτότητας (48 h, 37 °C, 75 oscillations/min) σε FaSSIF-V2plus και υάλινους περιέκτες.

Η προσρόφηση του SB στους ηθμούς RC και PTFE αξιολογήθηκε με τη χρήση της *in vitro* διάταξης (Σχήμα B.1) και τοποθετώντας SB διάλυμα συγκέντρωσης 12 μg/mL στο γαστρικό διαμέρισμα. Αυτή η συγκέντρωση αντιστοιχούσε σε 3 mg σκόνης SB και ήταν η μέγιστη ποσότητα, που ήταν δυνατό να διαλυθεί σε HCl διάλυμα pH 2,5. Συγκεκριμένα, για την παρασκευή του SB διαλύματος συγκέντρωσης 12 μg/mL προστέθηκαν 3 mg σκόνης SB σε 240 mL HCl διαλύματος, pH 2,5, και σε αυτά προστέθηκαν 10 mL HCl διαλύματος, pH 1,8. Μετά από 5 κύκλους στους υπέρηχους (37 °C, 20 min/κύκλο)] και ανάδευση υπό μαγνητικό

αναδευτήρα (περίπου 37 °C, 30 min/κύκλο) τα 3 mg διαλύθηκαν παρέχοντας ένα διάλυμα συγκέντρωσης SB 12 µg/mL.

**Πίνακας Π9.2:** % προσρόφηση της δραστικής ουσίας SB σε ηθμούς PTFE και RC.\*

<b>Χρονικό διάστημα (min)</b>	<b>% προσρόφηση στους ηθμούς PTFE</b>	<b>% προσρόφηση στους ηθμούς RC</b>
<b>0-15</b>	2,0	7,5
<b>15-30</b>	2,6	6,0
<b>30-45</b>	4,8	20
<b>45-60</b>	2,3	5,9
<b>60-75</b>	6,3	10

\* Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υάλινους περιέκτες και για τη διήθηση χρησιμοποιήθηκαν υάλινες σύριγγες. Τα δείγματα διηθήθηκαν δυο φορές (κάθε φορά με νέο ηθμό). Πρέπει να τονιστεί, ότι 5 mL δείγματος απαιτούνταν για τον κορεσμό των ηθμών PTFE και 0,02 mL δείγματος για τον κορεσμό των ηθμών RC.

## **Παράρτημα 10**

### **Αναλυτική παρουσίαση των πρωτογενών δεδομένων, των κλασμάτων καθίζησης και των δεικτών υπερκορεσμού που συλλέχθηκαν/υπολογίστηκαν στην παρούσα Διατριβή**

Π.10.1 Μεμονωμένα δεδομένα της κλινικής μελέτης ανά φάση χορήγησης και εθελοντή	Σελ. 193
Π.10.2 Γραφικές απεικονίσεις των μεμονωμένων δεδομένων της κλινικής μελέτης ανά φάση χορήγησης και εθελοντή	Σελ. 205
Π.10.3 Άλλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των μεμονωμένων δειγμάτων της κλινικής μελέτης	Σελ. 230
Π.10.4 Μεμονωμένα δεδομένα για <i>in vitro</i> καθίζηση και υπερκορεσμό	Σελ. 241



## Π.10.1 Μεμονωμένα δεδομένα της κλινικής μελέτης ανά φάση χορήγησης και εθελοντή

### Εθελοντής #1

#### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	7,23	1,174	78,99	81,91	27,45	14,59
10	4,09	1,662	98,70	86,78	58,16	188,56
20	6,78	5,988	20,45	20,41	15,92	33,53
30	6,99	8,059	5,55	5,38	ΔΜ	44,57
40	7,68	1,828	1,60	1,46	0,66	86,34
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	5,00	2,501	3,08	2,95	3,12	44,39
<b>DPD-H</b>						
5	5,33	3,014	185,10	178,10	137,40	67,86
10	3,23	0,867	288,70	281,82	220,54	616,43
20	7,42	11,085	147,74	147,52	121,65	94,96
30	6,78	4,860	114,41	114,45	97,87	61,80
40	6,70	2,047	83,22	80,27	72,30	34,98
50	7,43	3,763	46,59	41,81	36,58	50,79
60	7,63	ΔΜ	18,75	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	7,57	4,276	11,72	11,12	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

#### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	5,97	0,065	281,94	247,11	29,35	15,46
10	2,93	0,284	342,94	365,94	338,48	1084,33
20	2,28	1,330	307,00	285,45	249,85	2639,75
30	2,48	2,270	184,60	123,67	101,92	2099,35
40	7,08	9,133	52,90	47,76	40,30	93,19
50	6,83	7,135	19,44	18,71	12,56	55,34
60	6,23	0,393	9,61	8,96	6,16	13,06
70	3,15	0,472	11,70	11,56	ΔΜ	978,40
<b>KCZ-H</b>						
5	5,78	9,458	846,23	828,14	381,75	212,12
10	2,50	0,951	902,76	907,04	835,58	2988,65
20	6,21	4,931	538,86	528,21	51,96	52,02
30	6,51	2,727	268,96	264,62	42,86	22,05
40	6,39	3,329	89,60	89,79	76,07	30,36
50	5,38	2,664	69,00	64,03	47,41	29,12
60	6,08	4,449	54,65	53,12	ΔΜ	52,99
70	4,04	2,288	55,45	36,03	32,29	552,11

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #2

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	2,20	0,051	69,37	70,29	69,22	2857,61
10	5,85	0,038	ΔΜ	61,29	23,04	16,37
20	1,86	0,658	63,94	60,10	56,02	4976,92
30	6,62	2,770	33,42	29,93	28,02	ΔΜ
40	2,36	0,389	24,50	24,44	23,65	1929,18
50	2,90	0,841	ΔΜ	9,08	8,71	317,27
60	6,66	1,068	3,20	3,45	2,66	40,68
70		ΔΜ				
<b>DPD-H</b>						
5	2,93	0,099	238,46	250,87	226,40	1206,81
10	6,65	3,880	183,88	168,71	148,90	16,23
20	4,87	8,109	161,45	142,93	76,22	263,83
30	5,10	2,323	90,56	76,89	31,44	66,66
40	3,00	0,428	92,55	89,29	87,99	928,05
50	2,85	0,079	83,19	80,20	82,02	1175,58
60	5,63	1,644	51,63	47,63	26,30	72,61
70	4,95	3,235	60,75	53,07	26,09	167,31

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	2,26	0,052	268,49	243,66	233,38	2488,43
10	7,40	1,225	76,03	74,74	67,28	18,73
20	5,55	2,830	125,12	116,19	86,20	34,04
30	6,71	0,889	40,13	41,96	30,68	13,57
40	7,06	0,168	19,84	17,86	12,75	23,11
50	7,16	ΔΜ	12,30	11,42	8,09	76,82
60	3,83	0,799	12,67	11,26	9,50	440,49
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>KCZ-H</b>						
5	7,34	3,067	223,05	242,10	223,69	143,13
10	6,90	7,685	297,75	ΔΜ	273,64	257,02
20	5,72	2,350	406,01	408,76	106,43	76,06
30	3,84	0,041	431,79	438,25	420,16	532,37
40	6,43	0,162	168,98	153,16	20,44	11,06
50	6,23	7,132	154,35	156,65	127,60	167,08
60	5,57	0,618	172,49	166,11	30,06	23,10
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #3

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	5,65	2,876	62,78	63,50	42,82	41,54
10	2,67	0,599	92,07	91,69	81,52	1001,38
20	6,23	3,322	63,57	64,68	54,92	43,67
30	5,98	7,834	44,23	42,58	35,20	76,59
40	6,59	17,806	30,58	30,46	25,56	141,00
50	6,70	ΔΜ	21,76	21,60	22,02	120,87
60	4,54	9,966	20,41	16,82	11,69	378,46
70	4,25	6,315	15,11	11,91	8,70	409,59
<b>DPD-H</b>						
5	5,75	4,432	241,59	230,89	118,00	103,81
10	5,16	3,857	249,89	237,89	109,50	130,90
20	4,72	10,320	280,17	210,45	134,42	201,46
30	6,18	12,089	200,18	200,10	105,73	138,76
40	6,60	12,153	162,44	165,90	123,74	137,95
50	7,03	4,726	96,92	96,45	94,79	ΔΜ
60	5,93	ΔΜ	122,01	118,45	126,57	180,73
70	4,38	4,044	198,72	133,83	90,67	284,89

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	4,11	0,951	337,66	211,05	188,85	289,37
10	6,18	1,175	283,74	281,28	27,11	16,53
20	6,05	4,022	254,89	254,14	99,80	47,35
30	3,28	0,860	183,38	117,05	106,33	737,99
40	5,73	ΔΜ	122,38	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	7,76	0,144	2,38	2,32	1,95	39,86
60	8,03	0,219	1,42	1,35	1,31	ΔΜ
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>KCZ-H</b>						
5	6,05	1,624	824,89	643,82	32,13	24,85
10	5,72	3,387	920,13	834,88	160,94	140,89
20	5,68	0,798	887,72	873,25	94,40	109,02
30	5,88	3,933	762,01	759,34	79,23	67,06
40	2,37	0,501	974,09	974,74	883,43	2924,74
50	4,82	2,875	832,47	764,30	531,24	207,37
60	4,31	3,098	555,14	402,37	332,12	547,00
70	5,92	7,472	239,94	233,40	193,24	120,50

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #4

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	6,03	0,304	ΔΜ	71,88	17,01	10,41
10	6,69	0,321	57,96	56,49	21,08	14,34
20	6,06	1,377	32,06	33,20	17,82	41,55
30	5,98	0,089	27,28	26,63	14,05	9,63
40	7,77	0,189	2,01	1,98	0,18	ΔΜ
50	7,65	ΔΜ	1,32	1,27	ΔΜ	115,01
60	7,04	0,218	1,13	1,02	0,33	43,98
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>						
5	2,43	0,462	470,57	471,96	ΔΜ	4126,65
10	2,48	0,547	437,60	438,63	ΔΜ	3916,63
20	2,21	0,360	329,03	342,01	ΔΜ	6413,52
30	5,88	6,128	213,53	209,07	119,60	96,16
40	3,83	2,116	151,06	137,15	98,75	440,00
50	4,21	1,241	107,70	103,87	71,23	274,51
60	5,37	1,014	63,13	64,21	40,73	49,04
70	6,70	ΔΜ	29,94	28,26	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	3,47	0,270	291,11	290,81	267,23	542,99
10	6,11	2,101	177,79	167,32	21,05	18,43
20	3,28	0,700	143,90	124,41	115,04	674,29
30	6,92	3,936	55,61	55,57	44,59	47,22
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	7,97	0,305	1,02	0,98	0,90	10,29
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>KCZ-H</b>						
5	3,32	0,786	850,34	707,69	685,32	1067,05
10	6,10	0,212	720,40	230,04	12,06	9,49
20	6,05	0,046	289,83	279,19	14,29	12,61
30	6,29	11,830	84,72	84,41	78,23	196,23
40	4,10	15,628	56,14	43,10	39,58	1882,06
50	6,99	0,614	20,52	19,57	16,44	11,58
60	7,69	ΔΜ	ΔΜ	1,39	1,27	ΔΜ
70	4,41	0,067	19,33	18,01	ΔΜ	190,92

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #5

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	2,17	0,090	79,65	80,22	65,23	3017,66
10	3,28	ΔΜ	80,09	84,10	68,00	655,76
20	6,54	7,187	74,74	77,46	57,66	47,63
30	6,38	10,171	58,17	59,33	42,61	67,71
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	5,98	4,257	ΔΜ	5,88	ΔΜ	45,56
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>						
5	6,92	1,305	303,19	245,85	29,59	39,04
10	7,03	2,275	252,91	249,71	45,23	31,27
20	6,61	8,280	230,94	238,18	199,34	103,00
30	6,97	10,939	159,46	163,87	145,74	ΔΜ
40	5,37	5,974	126,60	134,64	103,13	ΔΜ
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	6,63	4,188	101,42	99,95	61,74	44,20

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	6,03	1,724	308,36	308,27	ΔΜ	20,99
10	6,03	4,837	243,48	237,02	60,91	39,82
20	6,45	2,739	179,04	176,91	21,73	16,25
30	5,61	2,685	118,86	113,90	56,63	20,08
40	6,11	1,274	69,52	66,83	43,67	14,21
50	6,58	4,868	26,47	26,90	22,08	44,09
60	5,95	2,130	15,17	12,59	9,55	15,93
70	2,84	0,568	14,65	13,66	11,55	1464,08
<b>KCZ-H</b>						
5	2,53	0,181	1049,65	1027,40	997,94	2462,21
10	4,10	0,070	857,09	868,43	744,26	669,97
20	4,79	0,698	812,40	694,74	ΔΜ	269,58
30	4,96	1,796	587,33	527,32	203,96	55,32
40	2,31	0,835	755,82	706,70	654,44	3000,46
50	2,26	0,674	739,41	697,11	648,15	3219,48
60	5,61	2,616	442,79	410,86	51,40	37,88
70	6,73	2,043	184,87	177,69	101,30	35,52

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #6

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	6,53	0,857	68,46	68,02	22,47	16,45
10	7,51	0,417	23,11	22,99	20,06	12,43
20	6,60	ΔΜ	30,70	31,22	23,59	78,88
30	7,74	4,727	12,55	12,55	11,39	68,33
40	5,43	5,709	21,79	21,52	10,71	71,23
50	7,94	0,942	5,25	5,05	ΔΜ	11,14
60	7,90	0,351	2,16	2,12	1,62	ΔΜ
70	6,97	2,070	1,87	1,83	1,05	13,14
<b>DPD-H</b>						
5	7,07	3,174	199,35	200,26	52,29	30,36
10	6,67	5,862	211,36	220,87	191,88	69,73
20	6,80	3,905	138,03	139,99	119,11	55,07
30	7,67	1,634	19,52	19,40	17,87	11,76
40	7,13	0,356	15,03	13,74	12,34	15,17
50	7,26	0,298	22,80	20,75	19,11	9,87
60	7,19	ΔΜ	36,57	36,53	27,07	ΔΜ
70	7,06	11,925	71,62	76,18	68,01	187,55

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	6,53	2,550	279,11	285,71	20,01	16,35
10	6,77	5,925	259,88	253,60	70,33	42,14
20	5,72	4,472	202,91	193,71	79,59	37,58
30	7,29	1,136	31,44	30,62	24,84	12,63
40	7,95	0,358	ΔΜ	12,31	9,25	10,53
50	5,91	1,179	21,12	20,34	13,77	19,67
60	6,26	8,843	18,51	18,55	14,97	44,39
70	6,95	3,522	13,25	12,92	7,96	35,64
<b>KCZ-H</b>						
5	7,10	19,905	563,58	526,18	483,91	287,38
10	5,63	4,081	1084,32	1025,58	ΔΜ	107,23
20	5,64	0,487	993,72	591,22	24,64	20,74
30	6,64	0,623	291,36	198,22	19,98	15,33
40	6,33	1,739	217,94	185,29	28,74	22,17
50	6,79	2,507	74,72	72,08	32,75	16,75
60	6,18	17,272	97,76	94,46	75,97	267,60
70	6,55	6,660	59,73	56,20	53,63	82,85

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #7

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	5,78	4,894	91,67	95,73	52,21	42,34
10	5,95	9,180	81,79	83,25	47,83	95,21
20	8,17	ΔΜ	7,50	7,48	4,04	68,94
30	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>						
5	3,19	0,427	373,25	380,77	310,44	720,88
10	6,44	11,055	257,12	259,94	212,31	100,79
20	7,22	9,077	69,05	69,08	61,40	81,13
30	6,39	ΔΜ	18,89	18,71	15,82	23,09
40	6,41	4,110	7,04	6,96	6,64	37,72
50	7,69	ΔΜ	2,40	2,06	ΔΜ	ΔΜ
60	7,81	0,069	1,16	1,15	1,16	87,42
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	6,09	6,200	300,89	300,30	93,35	49,65
10	6,32	1,295	233,84	234,23	23,84	15,13
20	3,52	0,044	136,62	134,71	125,70	540,76
30	5,67	0,068	75,01	65,20	31,73	15,29
40	6,20	22,022	24,71	24,31	25,56	350,27
50	7,35	26,827	24,88	26,17	26,15	282,06
60	5,61	4,956	19,32	17,09	15,78	66,82
70	6,52	ΔΜ	5,80	5,80	5,86	22,09
<b>KCZ-H</b>						
5	6,96	9,363	713,44	731,00	622,42	218,06
10	5,24	3,911	1019,89	924,78	196,35	109,54
20	5,03	3,001	863,79	712,34	189,28	265,98
30	2,60	0,258	804,07	789,07	703,93	1950,66
40	6,48	1,792	248,55	246,46	25,39	19,42
50	6,61	1,902	67,64	60,21	40,19	19,79
60	5,84	3,520	56,72	48,30	40,48	35,71
70	4,28	0,809	55,06	46,00	43,97	490,48

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #8

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	6,25	2,306	165,15	171,47	73,34	23,97
10	3,12	0,901	431,24	353,89	77,59	590,48
20	6,67	2,495	27,39	27,68	25,51	38,41
30	7,26	0,988	5,69	5,70	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	7,24	2,781	4,81	4,80	4,86	30,31
60	2,70	0,413	12,46	11,59	2,18	1936,52
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>						
5	3,86	0,456	255,79	256,88	259,68	420,37
10	3,50	0,561	261,24	247,53	241,35	509,79
20	7,27	4,336	99,65	100,58	93,64	ΔΜ
30	7,68	2,472	62,17	61,26	50,47	55,43
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	5,10	ΔΜ	24,93	23,14	22,86	21,59
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	5,70	2,437	15,56	14,41	14,12	84,61

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	5,62	0,225	290,96	251,56	23,43	14,31
10	3,54	0,043	284,29	283,57	300,55	545,32
20	4,62	2,455	217,51	188,36	112,57	33,08
30	6,86	8,234	105,39	98,37	96,49	89,18
40	6,39	4,851	47,14	52,00	31,43	20,50
50	6,23	2,855	26,47	26,14	24,00	33,68
60	5,38	0,474	14,78	11,65	10,16	29,43
70	1,88	0,400	9,73	9,29	ΔΜ	5166,13
<b>KCZ-H</b>						
5	7,57	5,837	273,35	287,28	265,89	89,63
10	6,33	2,577	505,10	553,20	23,52	19,18
20	6,53	5,447	465,42	459,96	66,33	23,18
30	6,48	5,145	321,65	344,82	206,81	54,62
40	2,74	0,851	451,04	336,09	264,83	1852,45
50	5,38	1,999	282,45	265,81	71,84	46,58
60	7,20	6,732	103,20	100,75	105,73	102,18
70	6,03	5,200	98,12	98,09	100,96	69,59

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε



## Εθελοντής #9

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	2,40	0,145	73,72	73,14	72,52	2107,01
10	2,23	0,199	83,52	83,50	82,21	2667,30
20	2,69	0,366	49,53	48,41	48,72	1582,94
30	2,01	0,099	39,66	39,04	38,59	5118,66
40	2,76	0,316	25,53	24,95	ΔΜ	ΔΜ
50	2,95	ΔΜ	16,31	15,98	ΔΜ	1126,67
60	4,44	3,190	6,99	5,86	4,65	258,63
70	3,89	0,685	4,68	4,63	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>						
5	2,30	0,058	309,87	304,80	279,72	2564,62
10	3,76	0,676	266,74	240,70	221,99	443,14
20	2,76	0,738	164,28	150,82	146,58	1299,90
30	6,03	1,791	104,04	103,83	58,72	42,20
40	1,89	0,283	170,92	164,58	159,24	6082,93
50	1,84	ΔΜ	160,02	159,49	149,11	7491,08
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	7,30	5,182	ΔΜ	138,25	81,81	ΔΜ
10	7,51	1,693	27,42	27,44	10,04	14,12
20	7,57	2,849	129,82	128,28	49,49	17,46
30	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
40	8,19	2,129	20,94	20,33	9,77	ΔΜ
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>KCZ-H</b>						
5	6,69	0,274	707,12	167,11	17,47	24,73
10	6,75	1,104	809,92	671,44	23,55	20,58
20	7,24	7,928	162,07	163,39	144,10	143,05
30	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #10

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	6,62	1,529	49,53	48,07	44,68	15,50
10	6,82	0,054	63,17	63,06	26,67	14,83
20	6,56	1,273	65,33	63,08	56,60	31,52
30	6,66	4,695	37,34	36,15	37,86	85,09
40	7,45	11,003	18,33	18,81	18,70	100,57
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>						
5	5,96	0,442	289,77	203,46	39,31	15,30
10	6,83	1,062	208,76	210,17	40,36	24,19
20	7,02	3,548	112,99	111,14	100,14	38,52
30	5,97	4,522	120,60	115,68	78,66	80,80
40	6,25	5,119	40,56	39,40	37,35	66,00
50	6,50	5,211	13,35	13,25	ΔΜ	45,00
60	6,03	4,280	10,69	9,98	ΔΜ	61,21
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	2,37	0,054	306,92	304,36	318,22	2392,51
10	2,25	0,131	293,63	291,76	317,78	2627,20
20	2,25	0,064	263,20	263,06	267,07	2640,91
30	3,05	0,157	159,61	158,79	172,85	1016,60
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>KCZ-H</b>						
5	3,19	0,021	1142,13	1107,97	992,93	1471,46
10	3,07	<LOQ=0,002	1068,53	1060,28	ΔΜ	1819,57
20	6,10	0,012	965,97	190,19	22,94	15,00
30	6,72	0,002	887,37	198,09	21,98	21,99
40	6,58	ΔΜ	836,15	752,51	31,43	25,39
50	6,55	3,177	743,14	677,52	36,77	36,51
60	5,48	0,316	897,54	549,57	23,33	99,18
70	6,77	0,841	457,68	354,48	30,33	26,91

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #11

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	7,16	3,735	74,06	73,30	54,90	35,20
10	7,52	8,993	82,94	82,59	57,70	71,43
20	7,22	6,275	75,01	75,68	54,40	50,75
30	6,43	0,239	89,49	87,27	18,39	21,34
40	6,80	0,038	53,23	53,14	16,51	27,85
50	ΔΜ	ΔΜ	6,32	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
60	7,85	0,019	3,33	3,31	1,32	8,33
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>						
5	6,60	0,673	212,91	187,28	38,03	20,60
10	6,92	5,034	249,92	249,36	183,84	99,51
20	6,16	4,353	276,95	275,57	167,44	72,67
30	6,91	0,672	213,84	163,56	31,18	33,43
40	8,09	0,201	77,57	76,44	19,80	28,61
50	6,81	0,068	84,12	81,15	28,65	21,28
60	7,55	0,041	11,89	10,81	7,51	38,34
70	7,25	0,034	30,91	30,05	23,58	30,01

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	6,70	0,486	286,46	204,15	24,34	14,10
10	7,43	3,058	191,50	189,34	146,75	35,73
20	5,12	0,223	294,36	278,87	34,23	20,53
30	6,65	0,039	180,95	118,66	26,90	12,65
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
50	5,15	0,165	84,95	77,97	59,36	24,96
60	6,79	ΔΜ	48,78	52,77	35,13	88,70
70	6,75	ΔΜ	36,55	35,45	20,00	21,03
<b>KCZ-H</b>						
5	5,98	0,024	594,98	248,21	21,23	17,60
10	6,91	ΔΜ	455,98	157,09	15,89	13,38
20	4,63	0,015	920,41	764,54	ΔΜ	417,17
30	6,02	0,020	624,98	319,55	15,89	12,73
40	6,60	0,010	417,35	226,38	16,92	12,80
50	7,23	0,017	174,97	156,79	23,43	12,40
60	7,34	0,036	281,12	209,37	17,29	18,19
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Εθελοντής #12

### DPD

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) διπυριδαμόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση διπυριδαμόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>DPD-L</b>						
5	5,37	0,429	87,49	93,21	39,79	20,77
10	7,11	2,098	51,94	51,61	38,04	23,52
20	7,39	7,453	22,26	23,58	16,34	44,25
30	7,02	5,158	15,53	15,77	10,91	25,05
40	7,75	5,191	4,73	4,81	2,23	22,25
50	8,06	8,035	2,97	2,94	1,40	51,03
60	5,79	2,495	1,94	1,90	ΔΜ	32,98
70	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>						
5	7,25	5,670	183,30	195,00	147,59	91,76
10	7,43	19,919	191,18	194,79	153,59	204,32
20	7,03	5,307	182,75	182,38	93,85	33,35
30	2,13	0,468	231,09	234,10	174,45	3290,97
40	3,54	0,352	187,56	197,76	155,86	446,75
50	2,47	0,823	146,30	140,89	124,37	2089,40
60	5,70	2,707	74,78	74,09	43,89	69,54
70	6,24	1,662	40,96	40,38	29,14	28,68

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

### KCZ

Χρόνος αναρρόφησης (min)	pH αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση χολικών αλάτων (mM)	Συνολική ποσότητα (μg) κετοκοναζόλης ανά mL αναρροφηθέντος δείγματος	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) στο αναρροφηθέν δείγμα	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C]	Συγκέντρωση κετοκοναζόλης (μg/mL) μετά από επώαση [48 h/37° C] παρουσία περίσσειας σκόνης
<b>KCZ-L</b>						
5	6,15	1,838	230,73	220,10	24,68	16,70
10	6,22	3,059	168,57	177,71	40,22	18,12
20	7,65	6,842	44,10	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
30	7,78	4,483	19,19	19,19	19,26	25,46
40	6,51	7,092	23,03	20,76	20,65	48,83
50	4,07	6,154	24,21	ΔΜ	19,33	580,89
60	6,60	4,690	13,88	13,61	12,85	22,15
70	2,20	1,297	11,88	10,26	ΔΜ	3302,24
<b>KCZ-H</b>						
5	5,87	3,823	858,33	856,69	28,49	25,99
10	6,56	1,800	679,86	596,47	25,24	16,91
20	2,87	0,770	438,28	430,85	328,38	1473,22
30	7,53	2,231	107,95	97,03	69,09	23,76
40	4,89	4,124	131,38	114,81	94,47	196,23
50	3,40	1,364	103,80	67,21	66,51	850,02
60	4,57	2,711	53,90	50,71	33,86	132,93
70	6,74	3,232	29,94	25,91	23,70	32,69

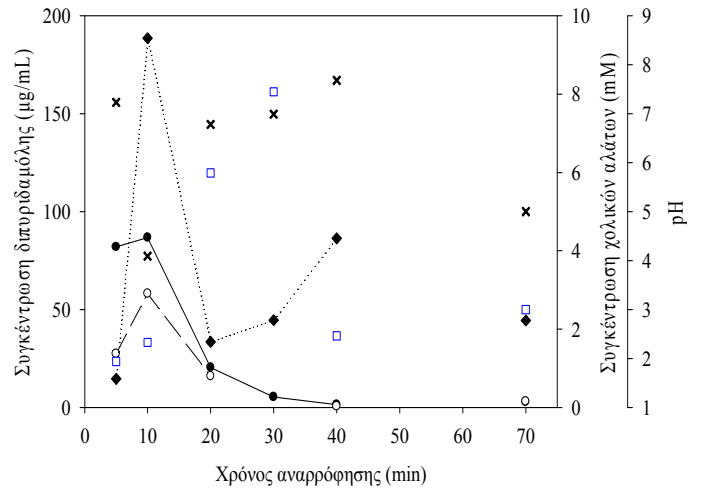
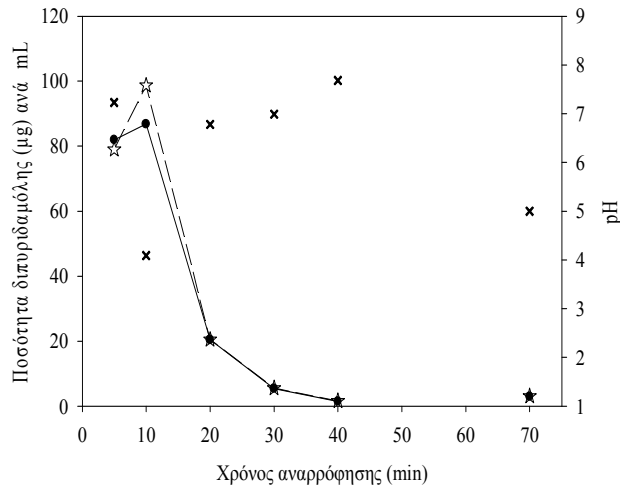
ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

## Π.10.2 Γραφικές απεικονίσεις των μεμονωμένων δεδομένων της κλινικής μελέτης ανά φάση χορηγησης και εθελοντή

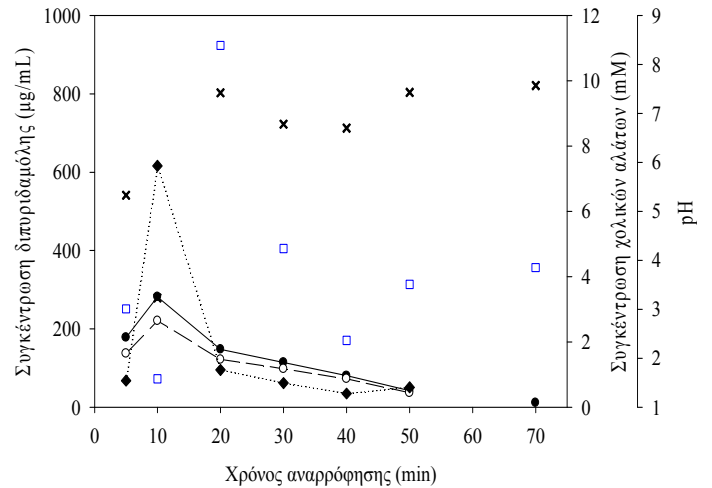
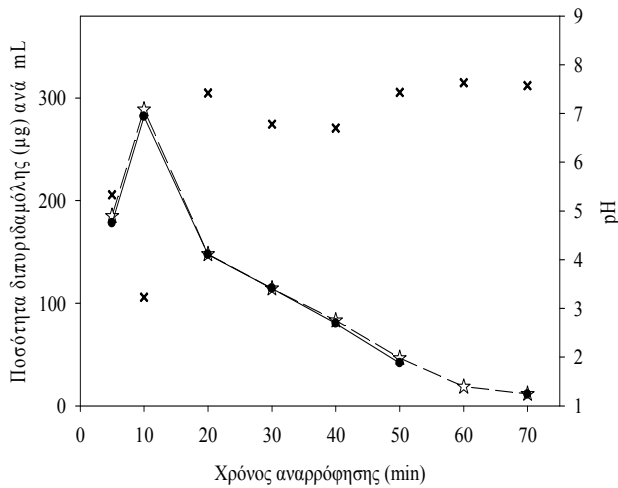
- × pH αναρροφηθέντος δείγματος
- Συγκέντρωση χολικών αλάτων στο αναρροφηθέν δείγμα
- ☆ Συνολική (στερεή λόγω καθίζησης και διαλυμένη) ποσότητα δραστικής ουσίας ανά milliliter του αναρροφηθέντος δείγματος
- (C) Συγκέντρωση δραστικής ουσίας στο αναρροφηθέν δείγμα
- ( $C_{inc}$ ) Συγκέντρωση δραστικής ουσίας στο αναρροφηθέν δείγμα μετά από επώαση αυτού (48h/37 °C)
- ◆ ( $C_s$ ) Συγκέντρωση δραστικής ουσίας στο αναρροφηθέν δείγμα μετά από επώαση αυτού (48h/37 °C) παρουσία περίσσειας στερεού ελεύθερης βάσης, που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των χορηγηθέντων διαλυμάτων (θερμοδυναμική διαλυτότητα κορεσμού)

## Εθελοντής #1

### DPD-L

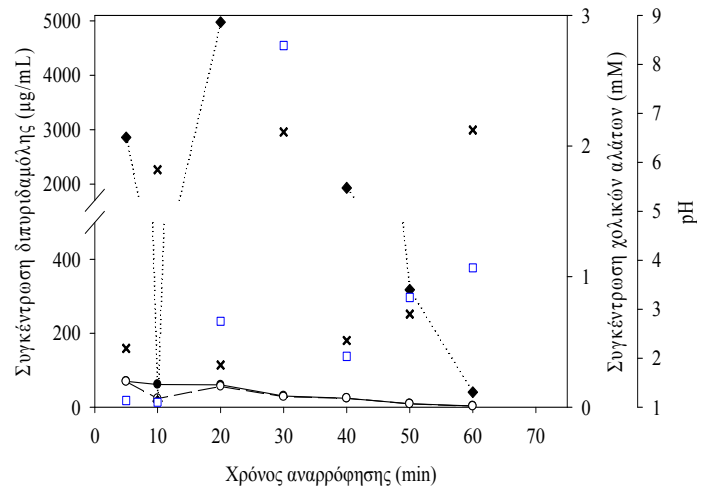
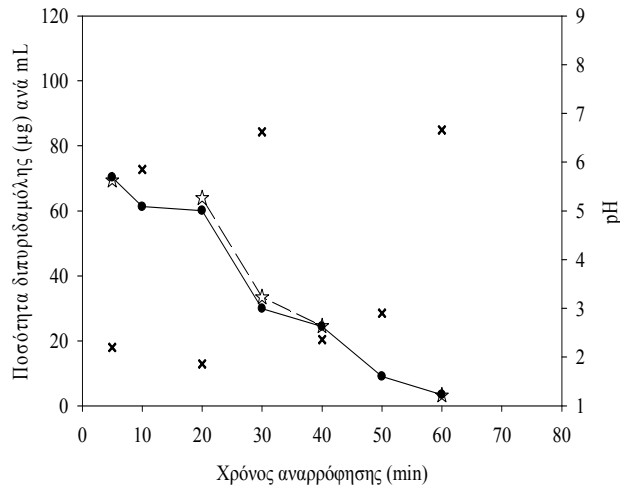


### DPD-H

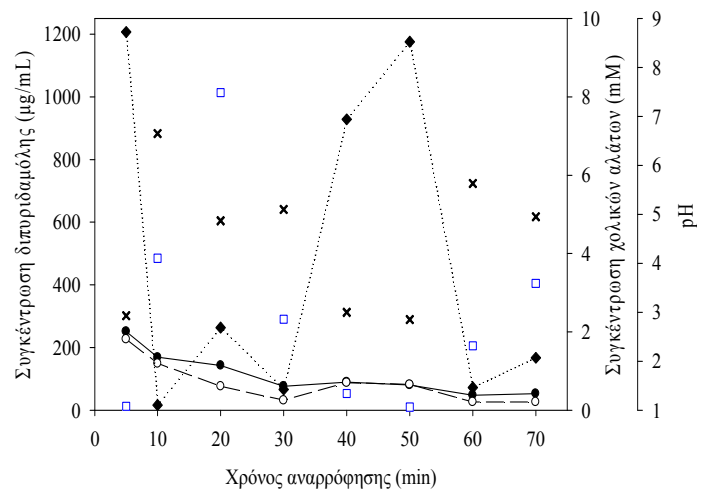
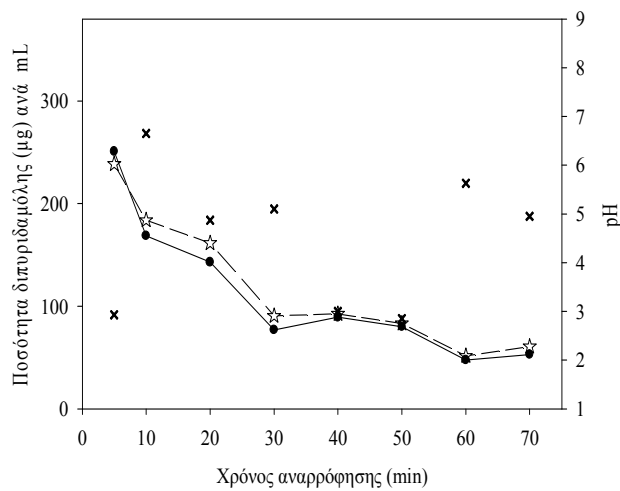


## Εθελοντής #2

### DPD-L

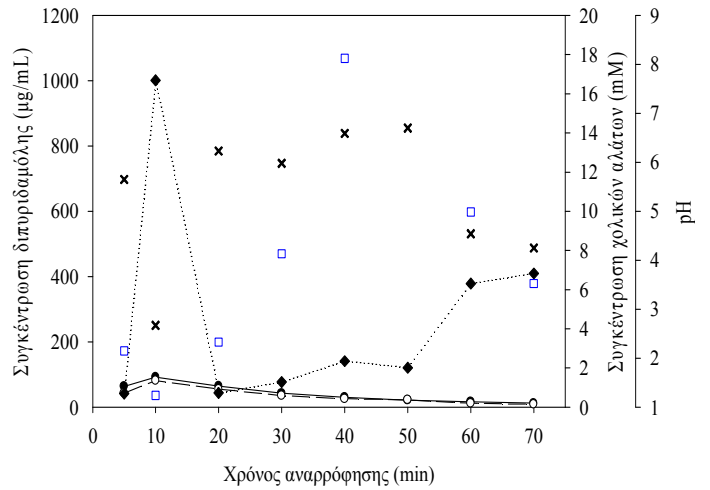
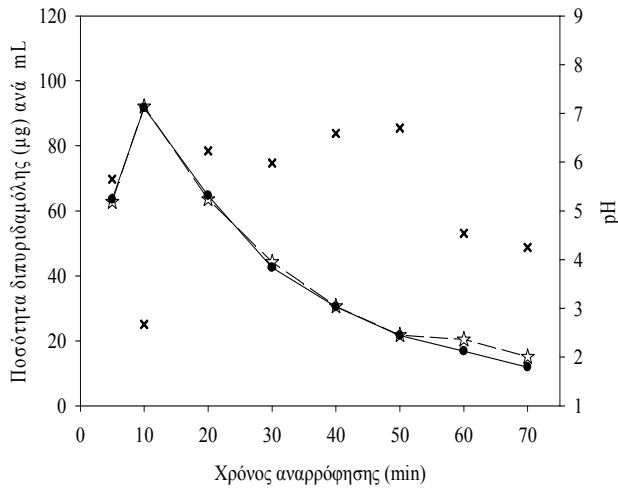


### DPD-H

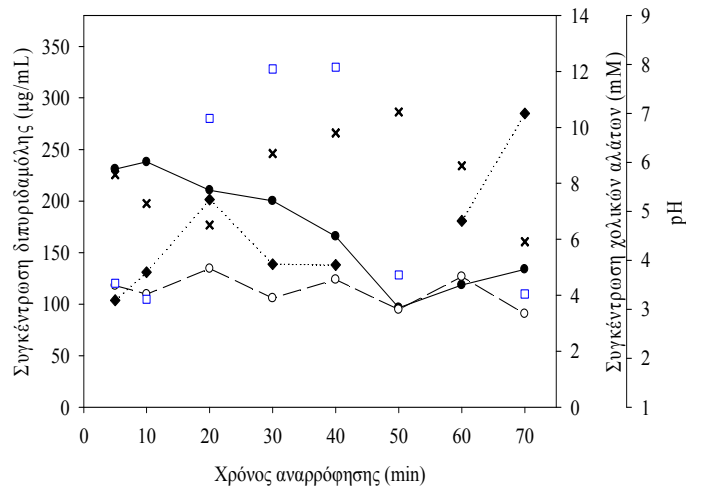
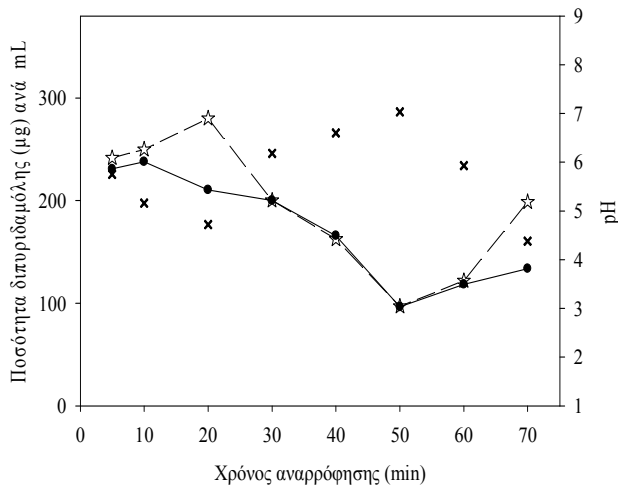


### Εθελοντής #3

#### DPD-L



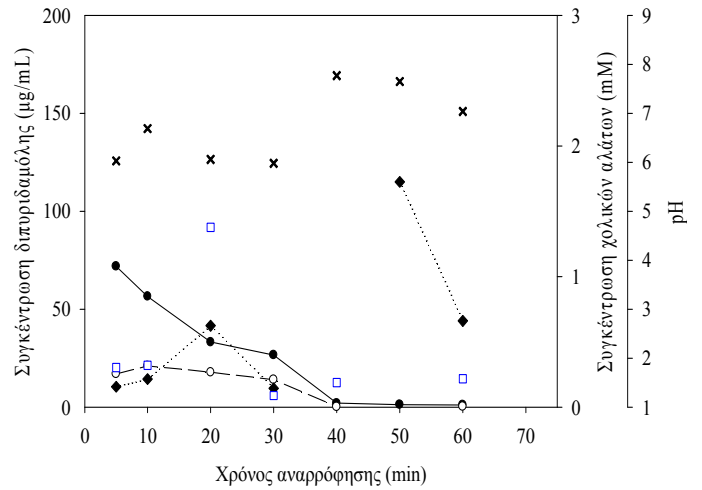
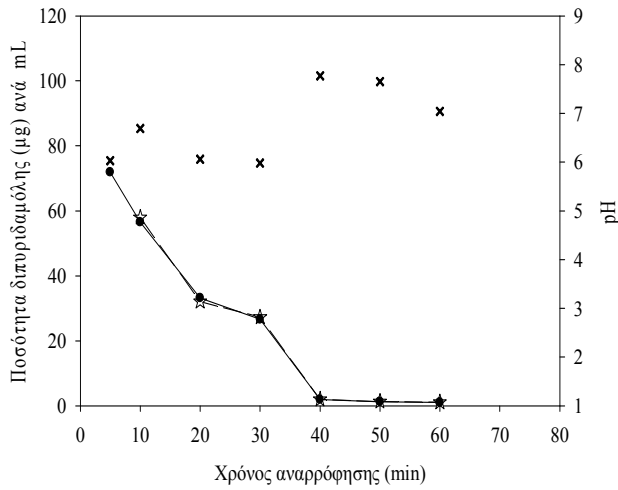
#### DPD-H



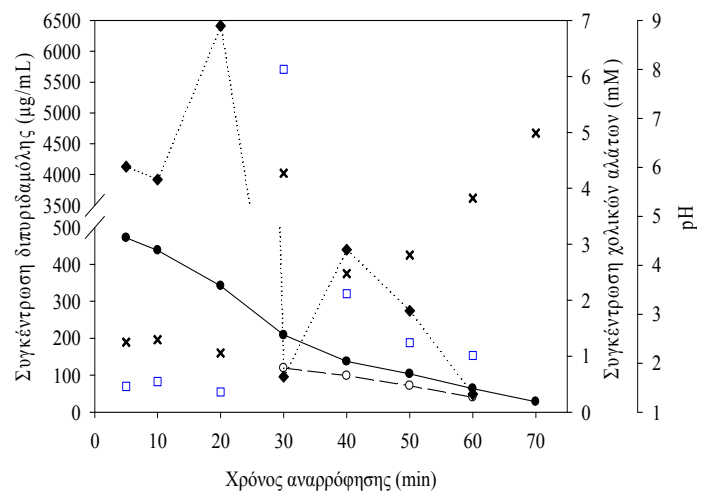
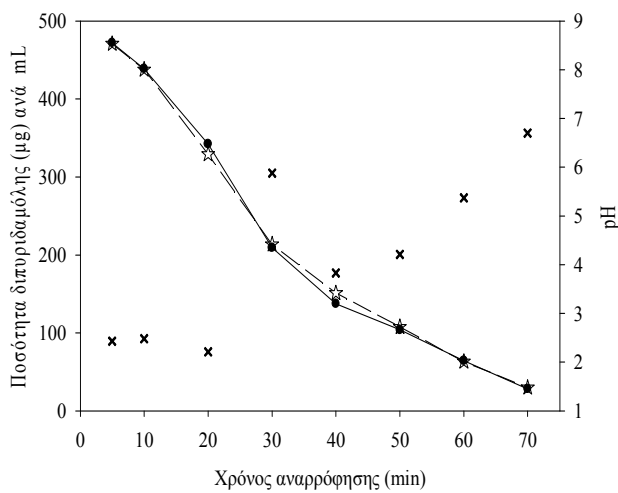


## Εθελοντής #4

### DPD-L

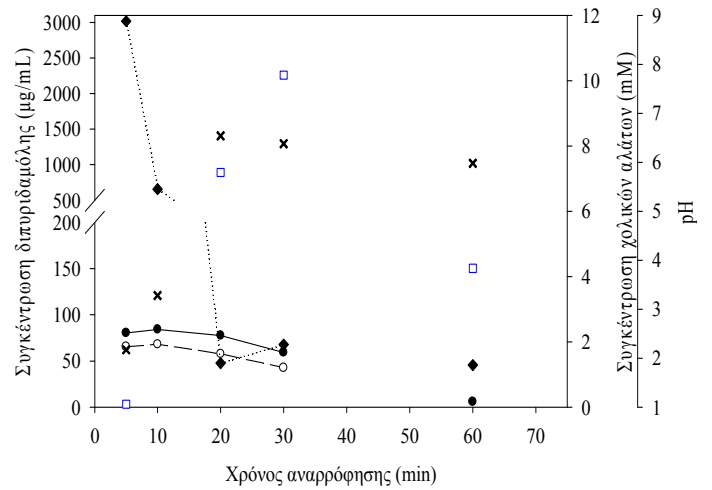
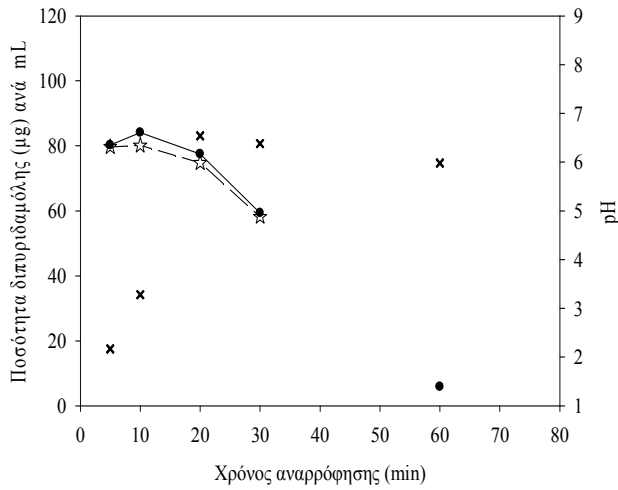


### DPD-H

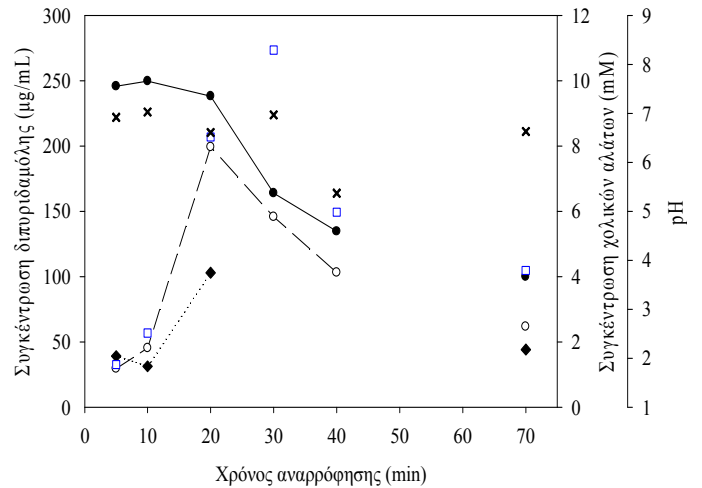
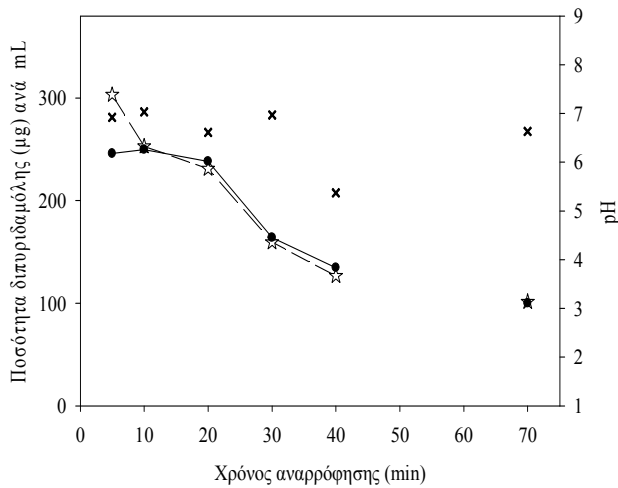


## Εθελοντής #5

### DPD-L

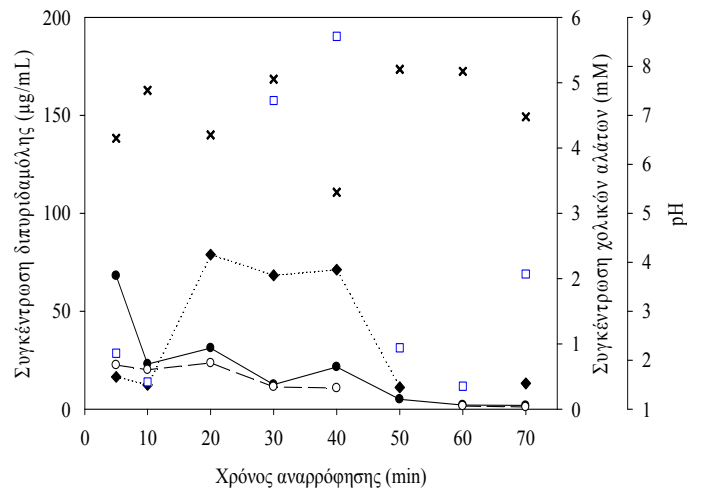
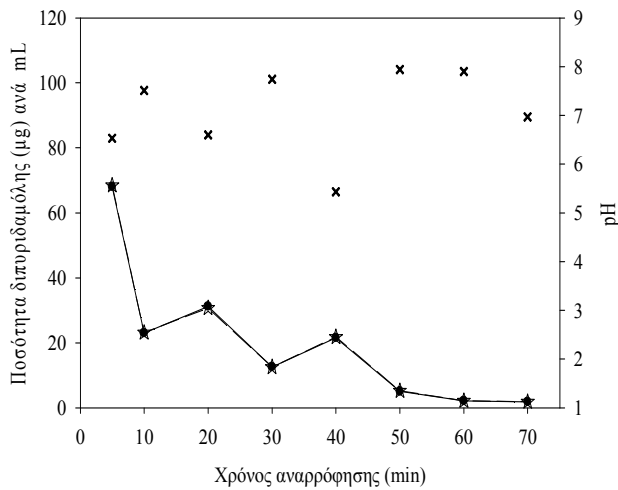


### DPD-H

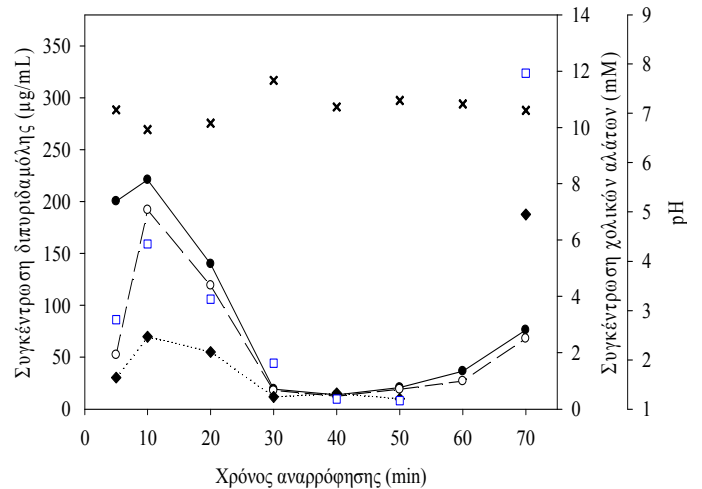
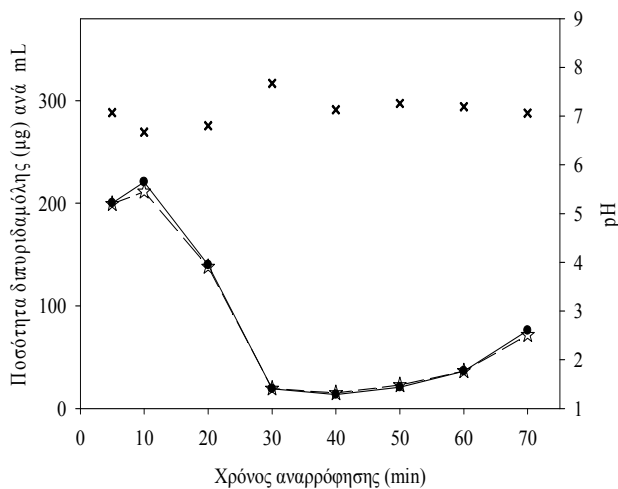


## Εθελοντής #6

### DPD-L

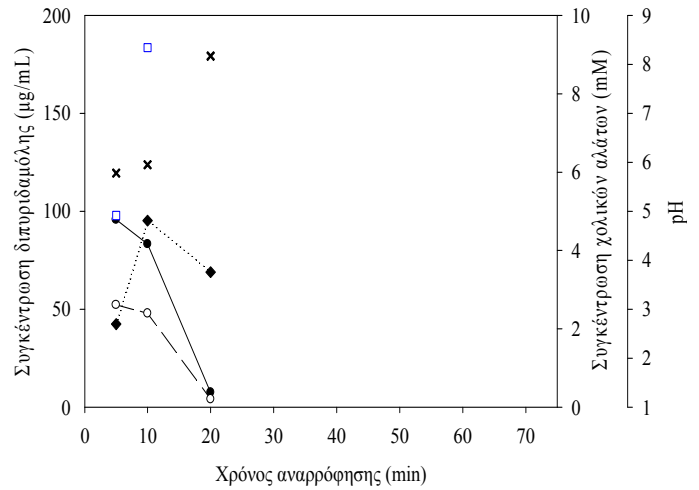
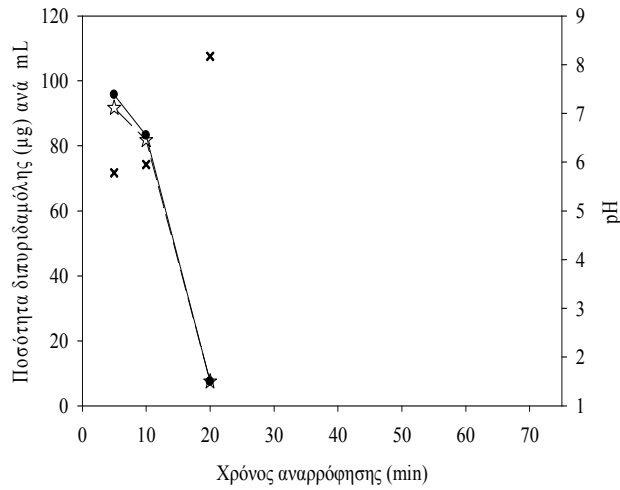


### DPD-H

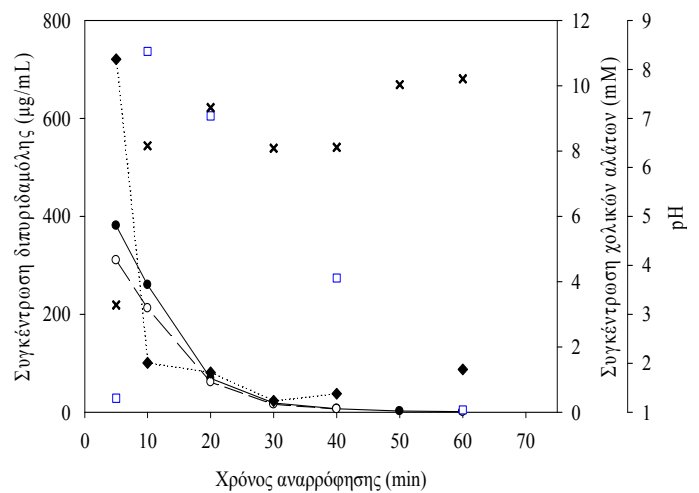
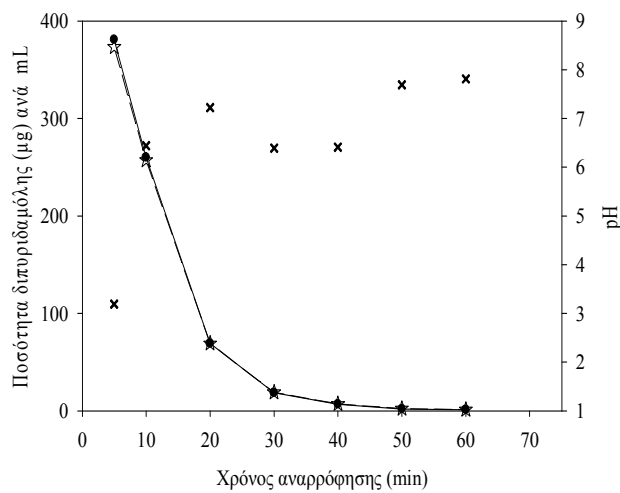


## Εθελοντής #7

### DPD-L

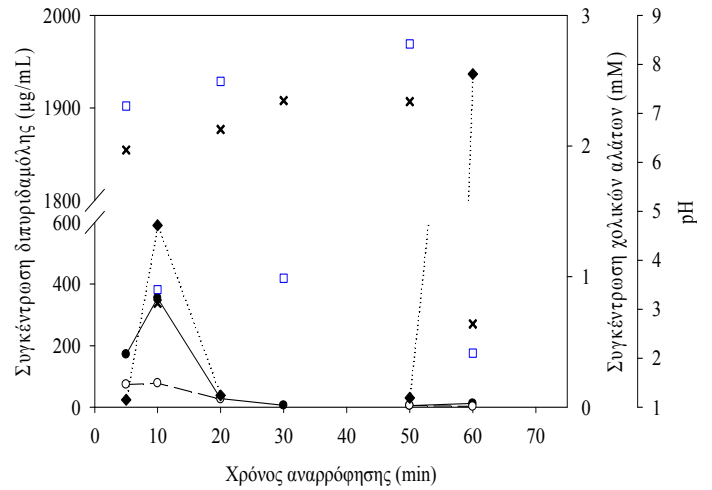
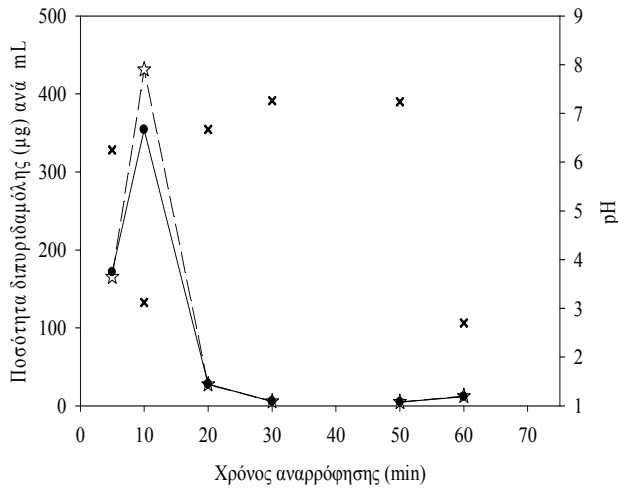


### DPD-H

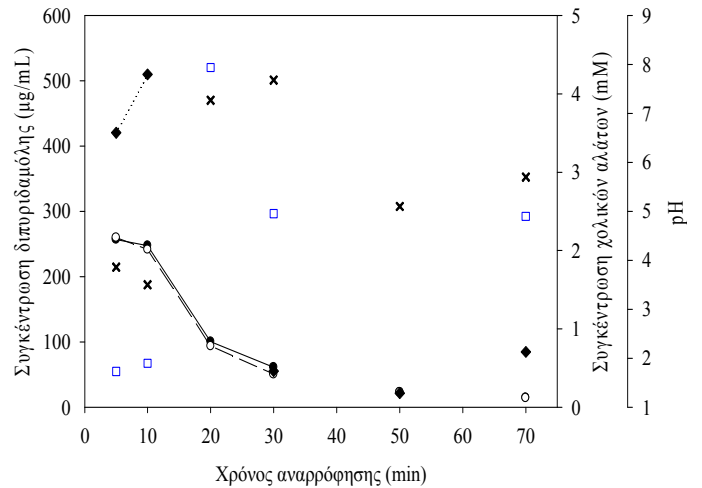
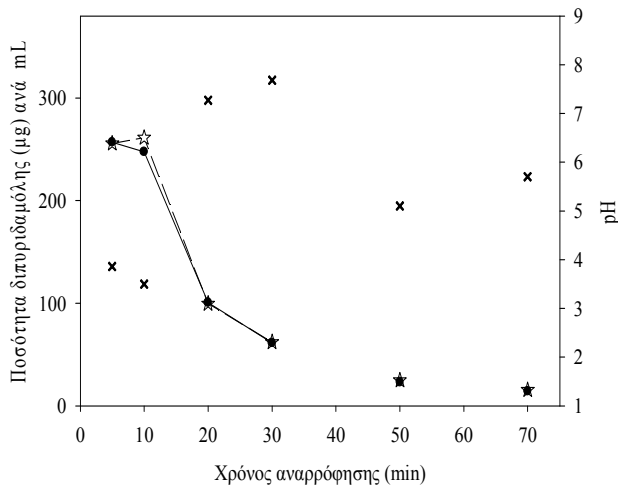


## Εθελοντής #8

### DPD-L

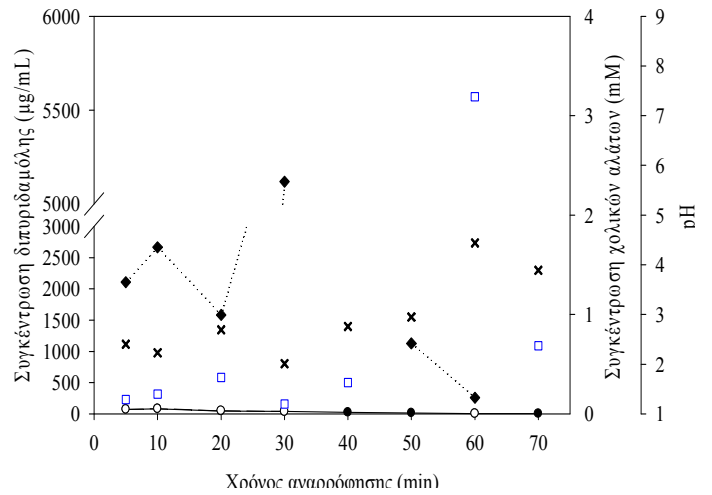
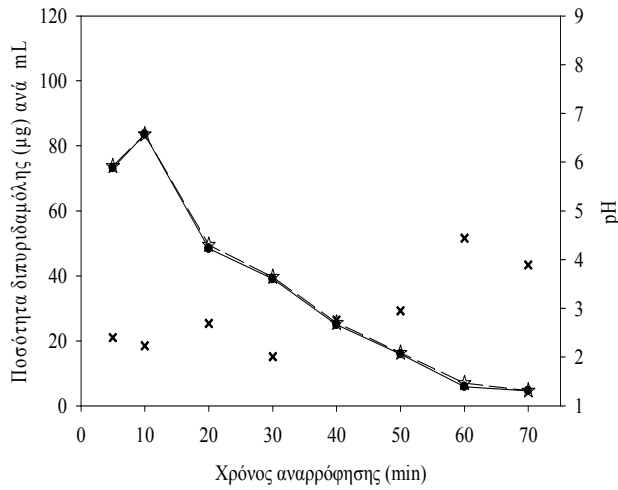


### DPD-H

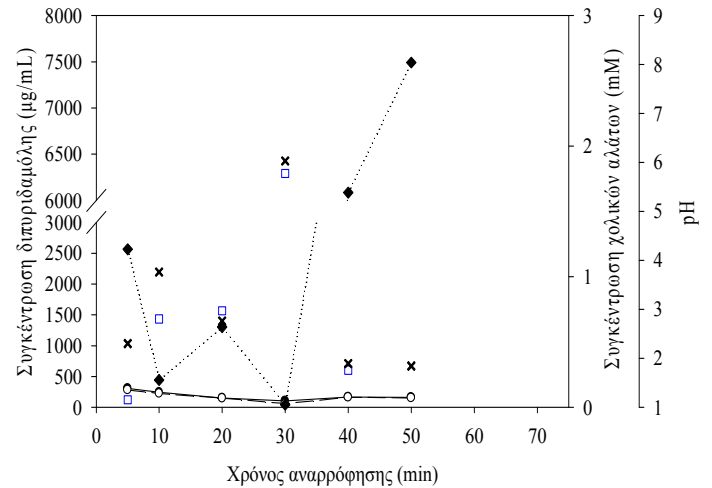
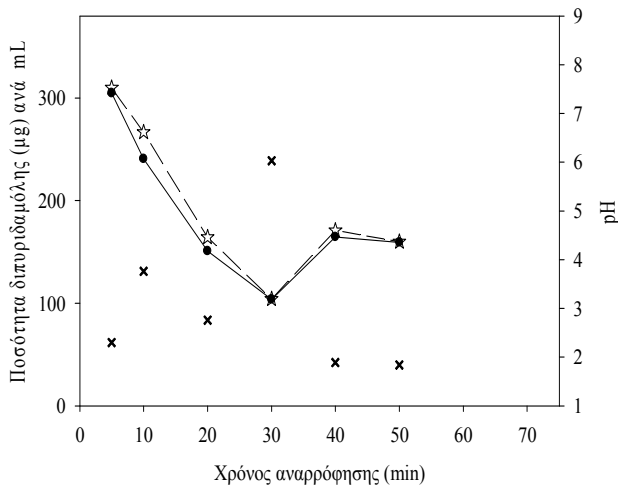


## Εθελοντής #9

### DPD-L

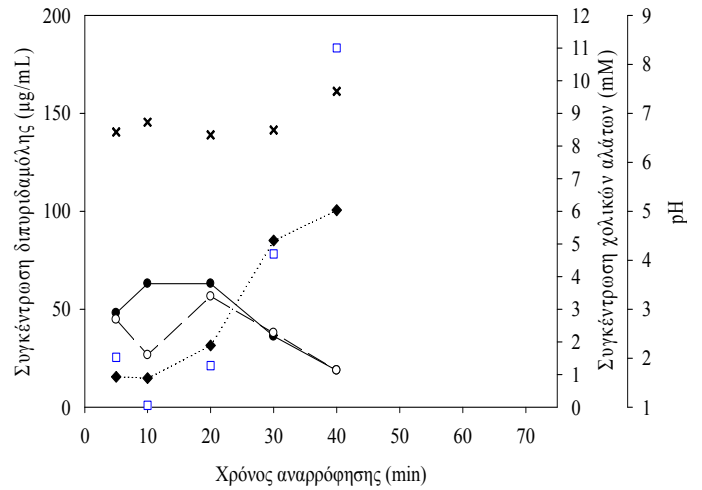
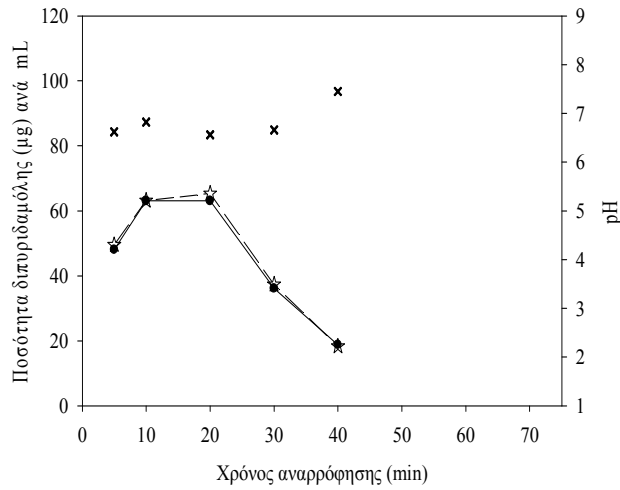


### DPD-H

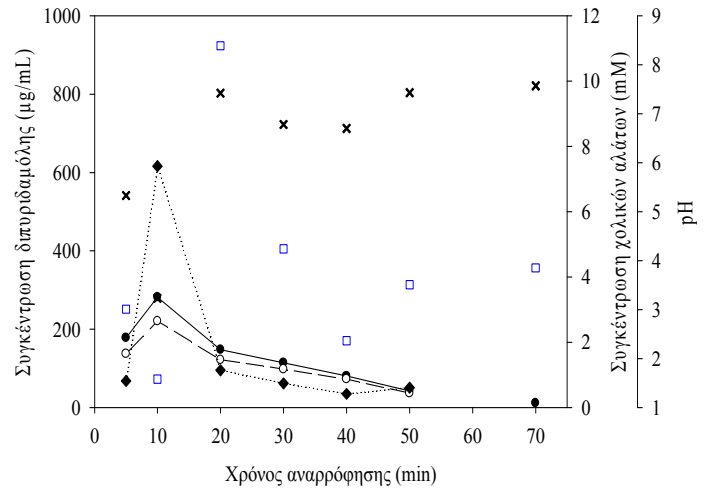
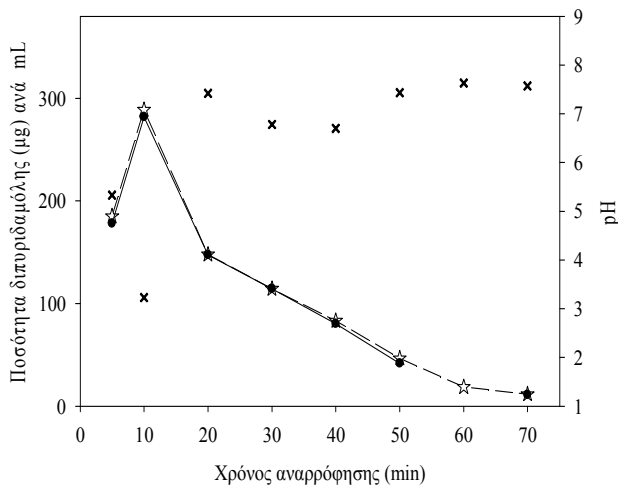


## Εθελοντής #10

### DPD-L

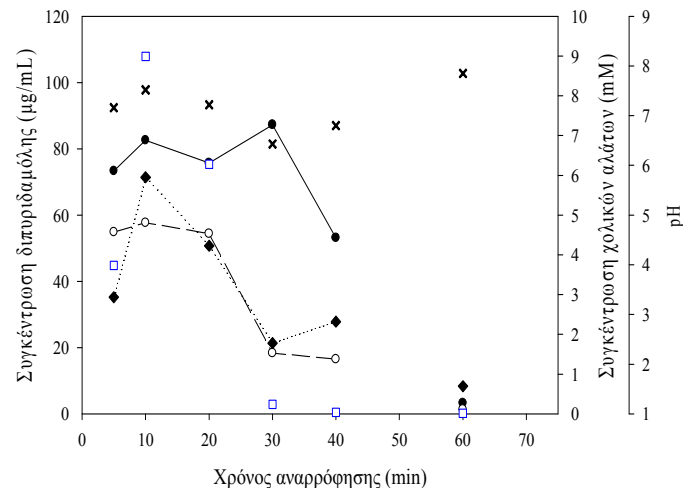
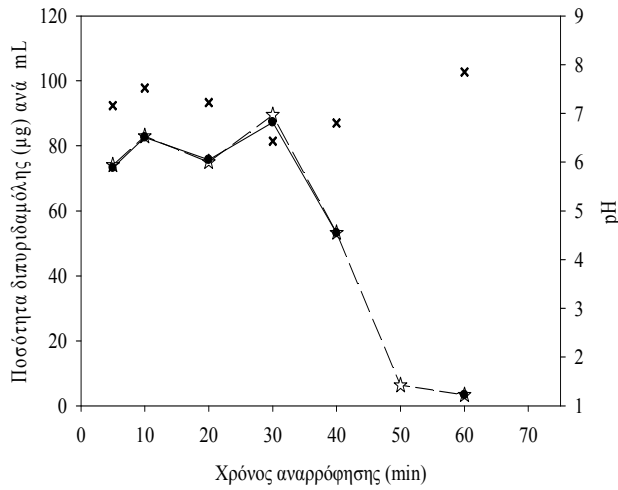


### DPD-H

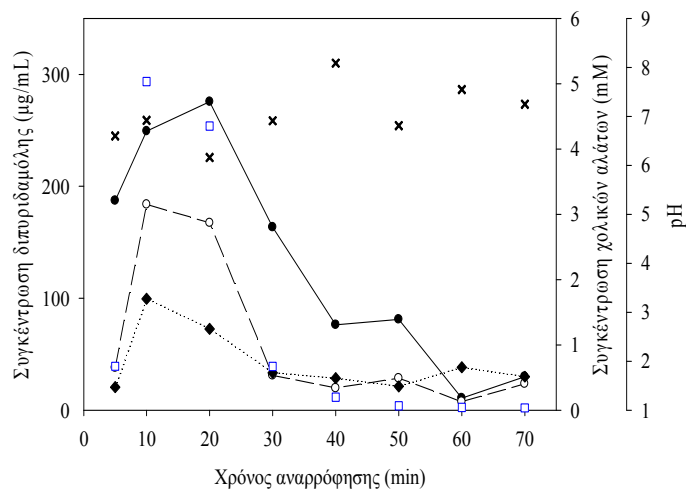
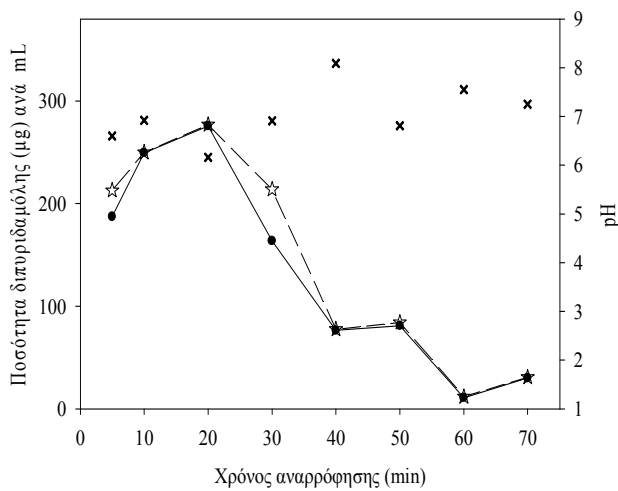


## Εθελοντής #11

### DPD-L



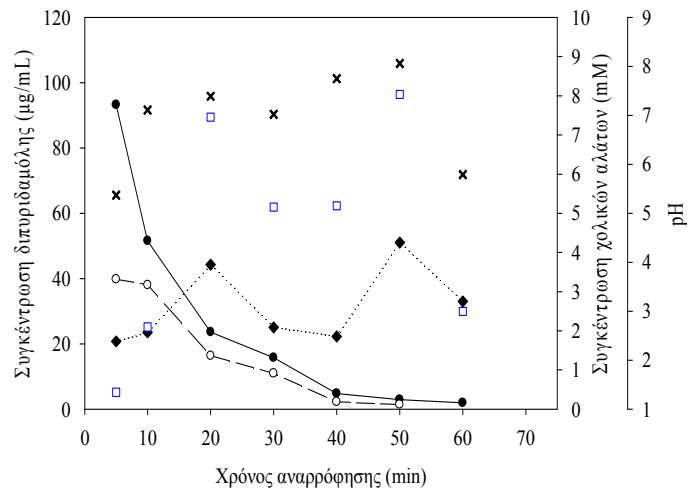
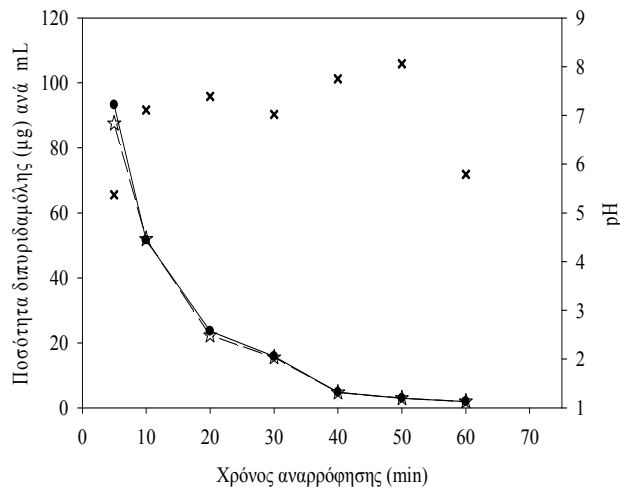
### DPD-H



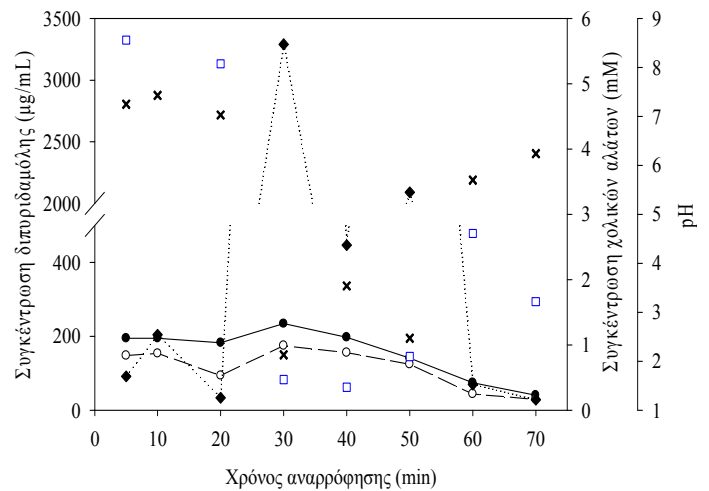
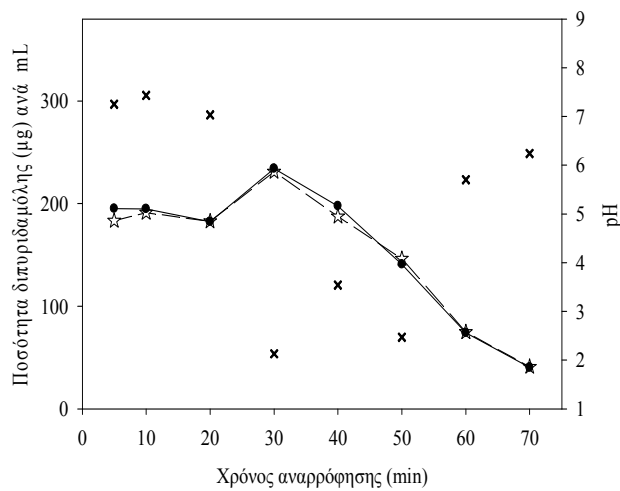


## Εθελοντής #12

### DPD-L

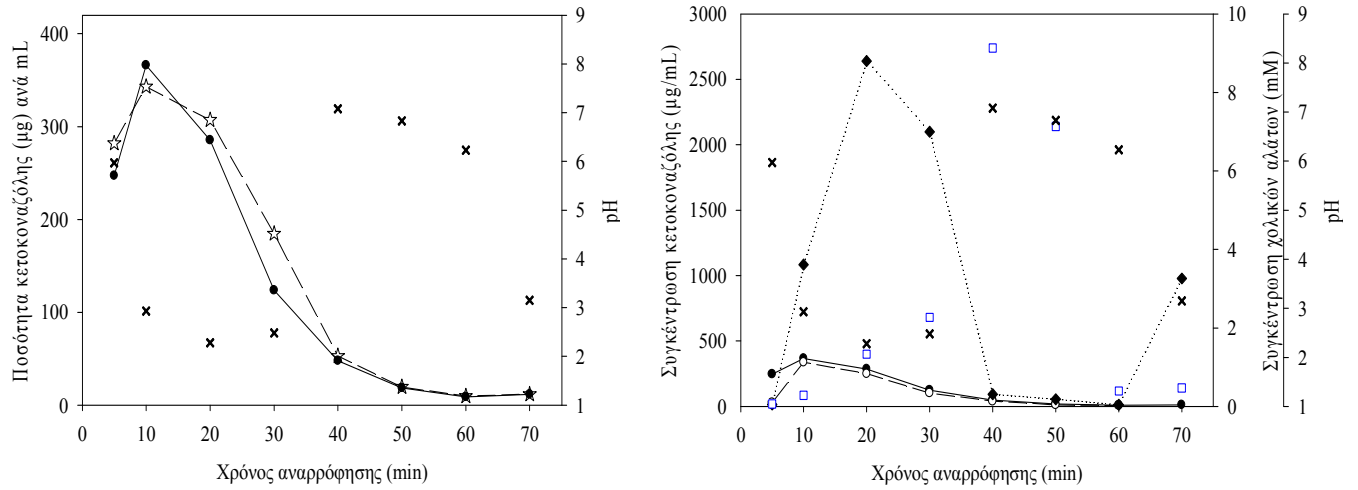


### DPD-H

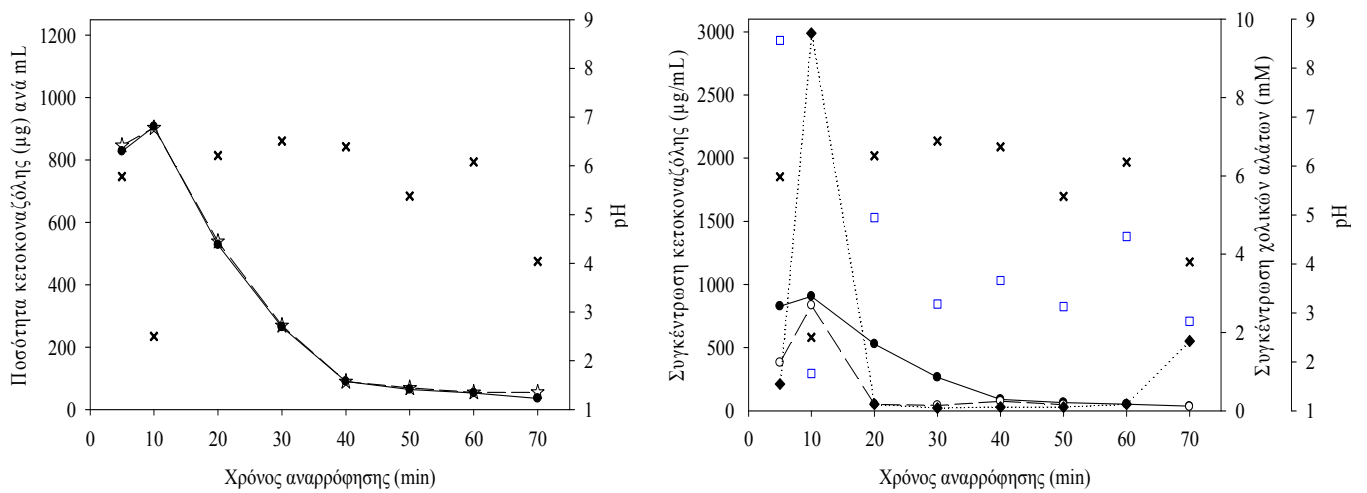


## Εθελοντής #1

### KCZ-L

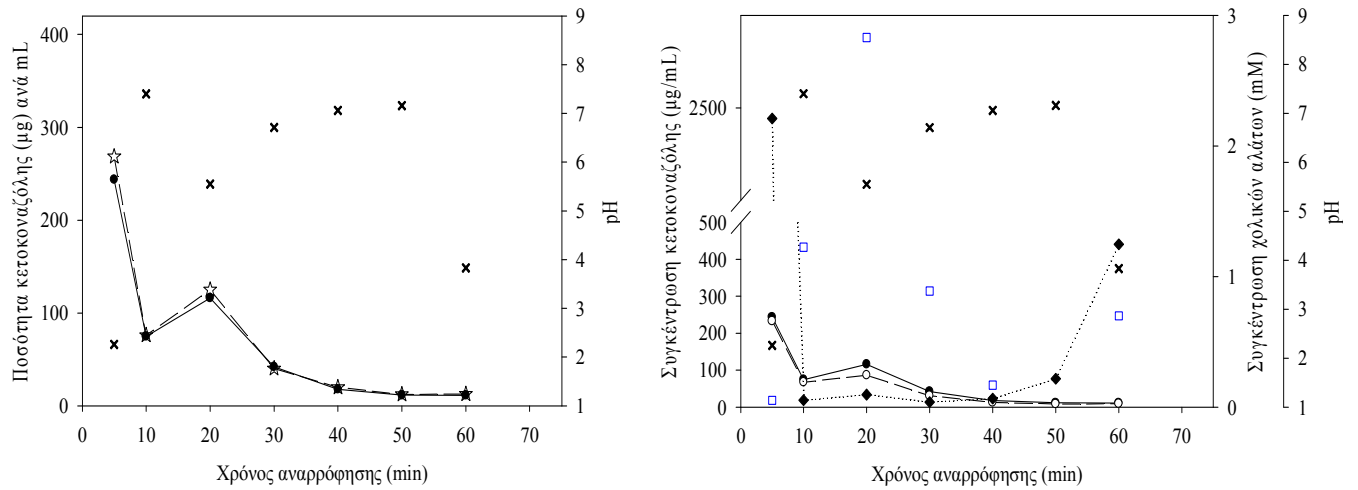


### KCZ-H

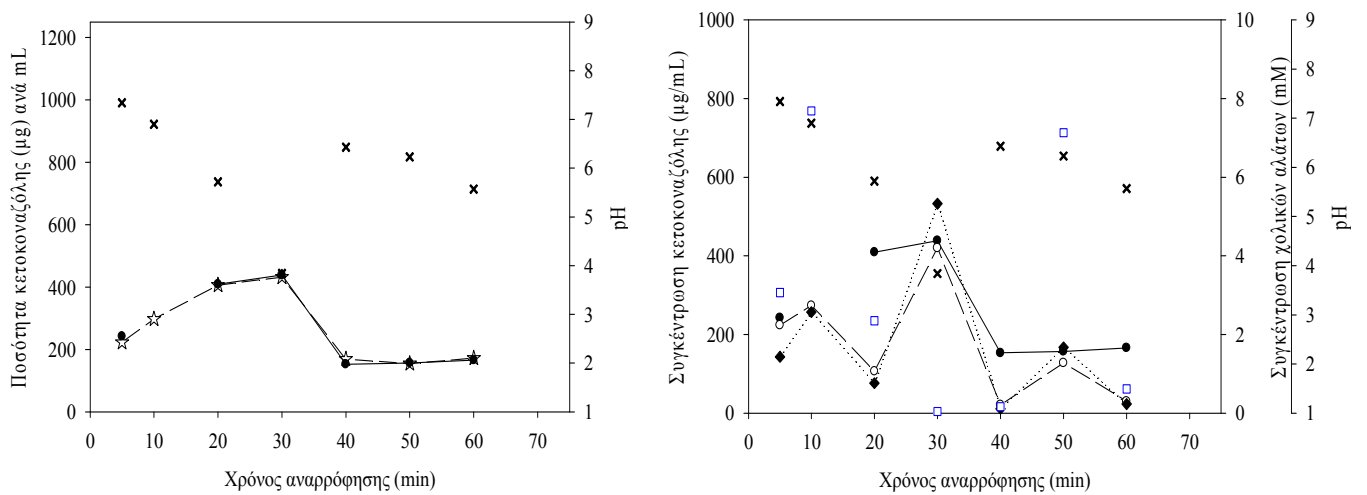


## Εθελοντής #2

### KCZ-L

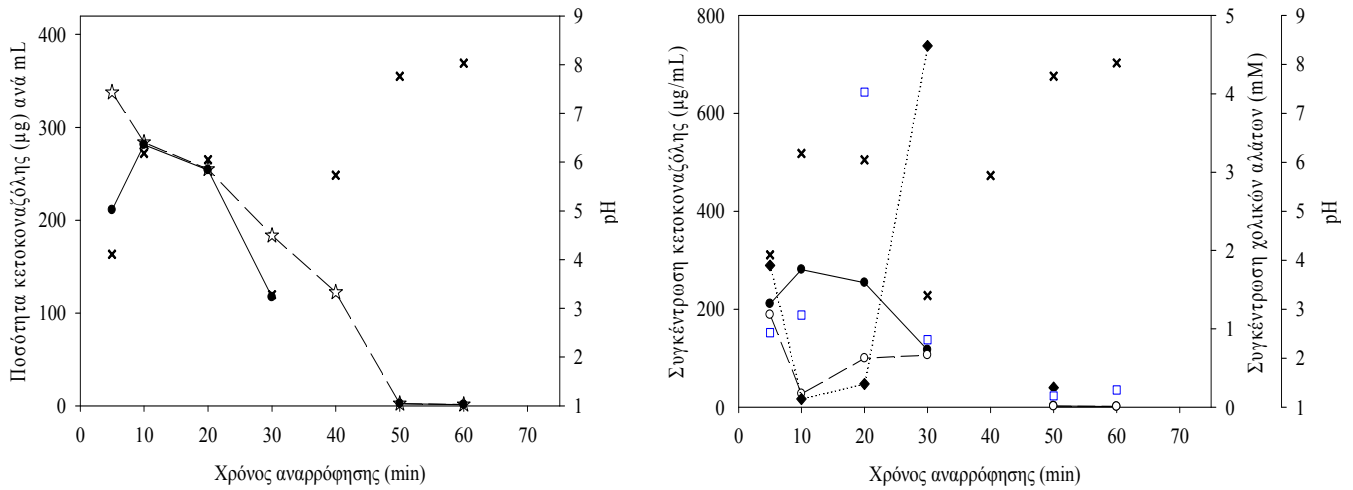


### KCZ-H

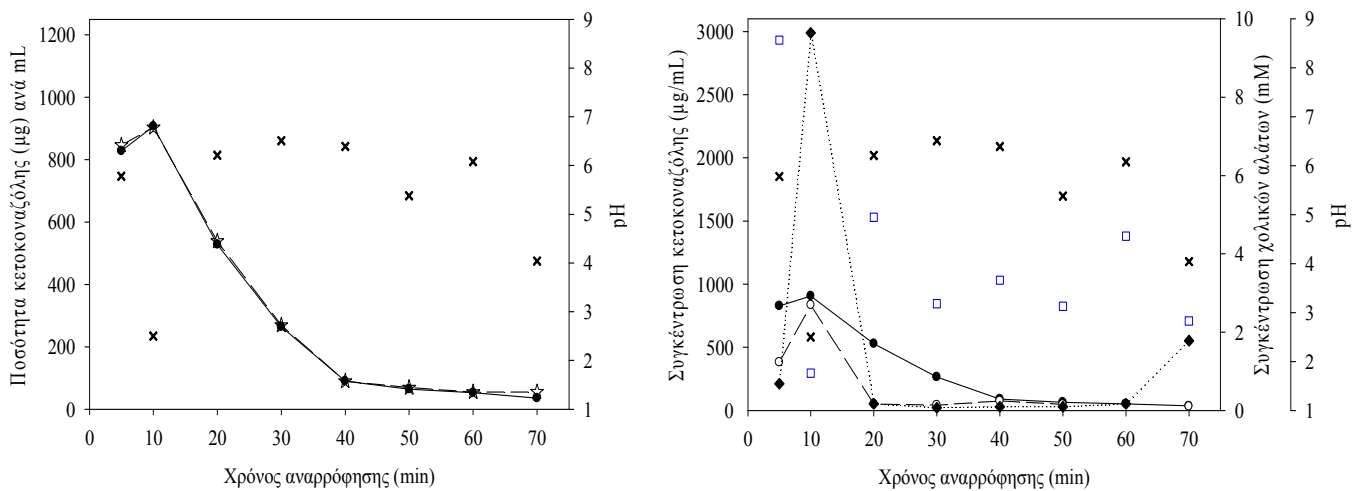


### Εθελοντής #3

#### KCZ-L

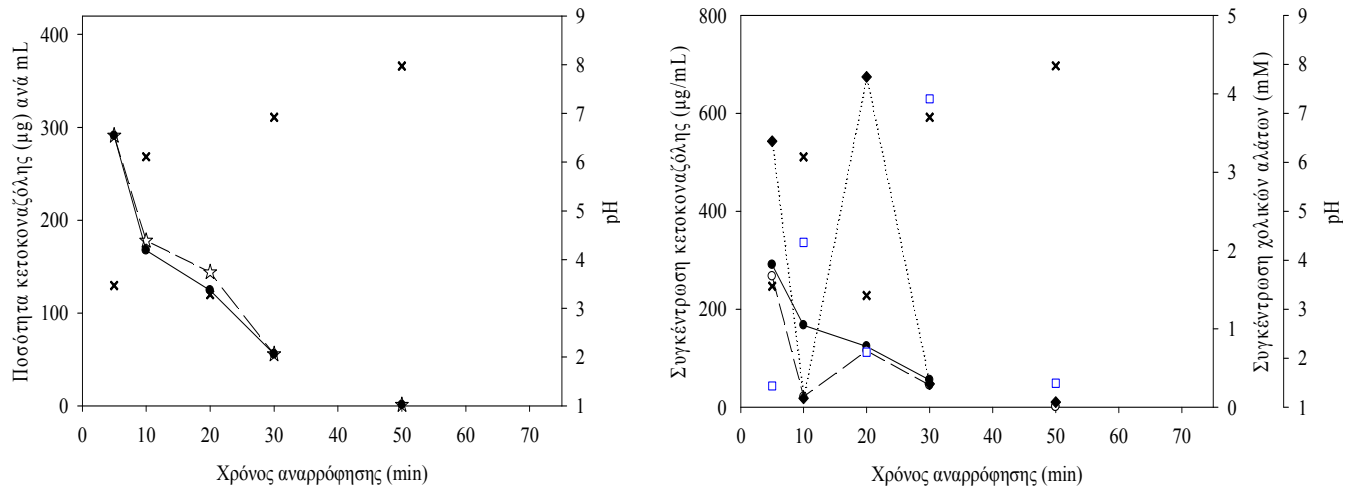


#### KCZ-H

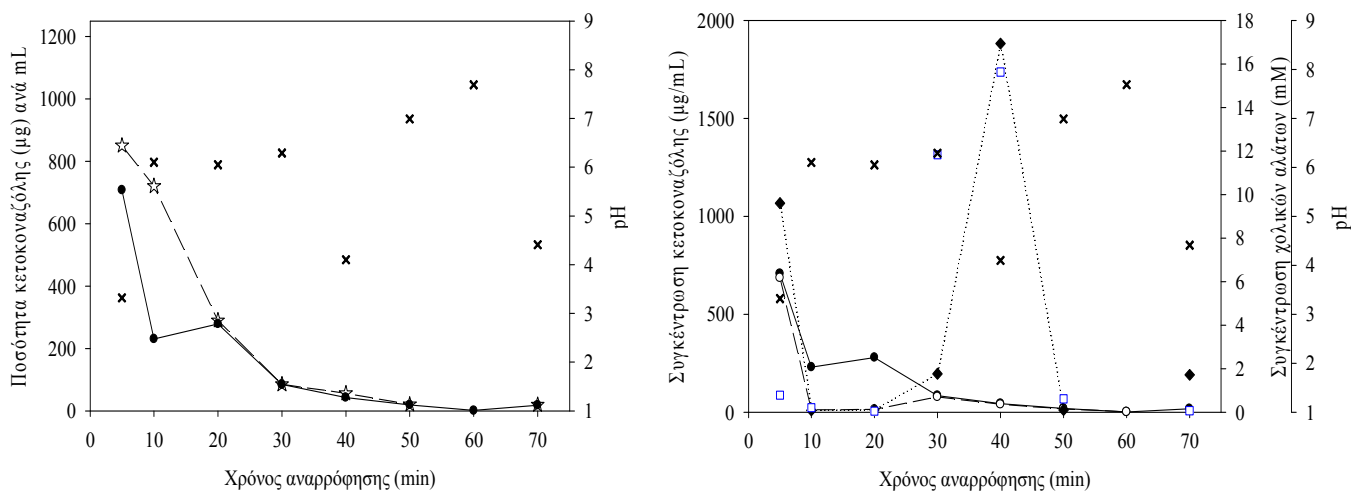


## Εθελοντής #4

### KCZ-L

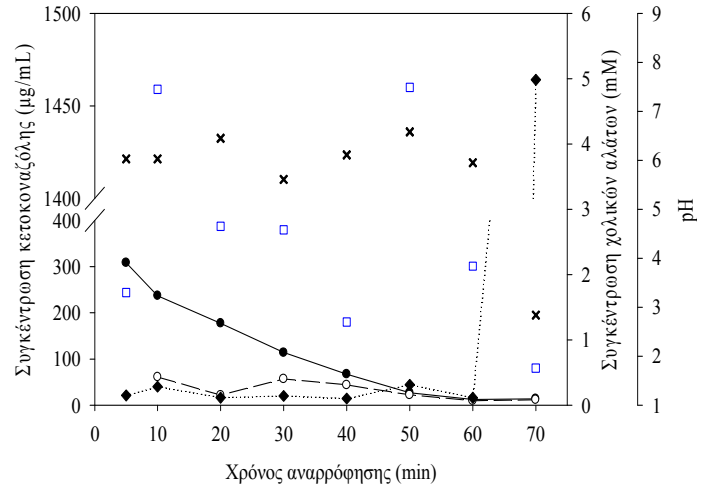
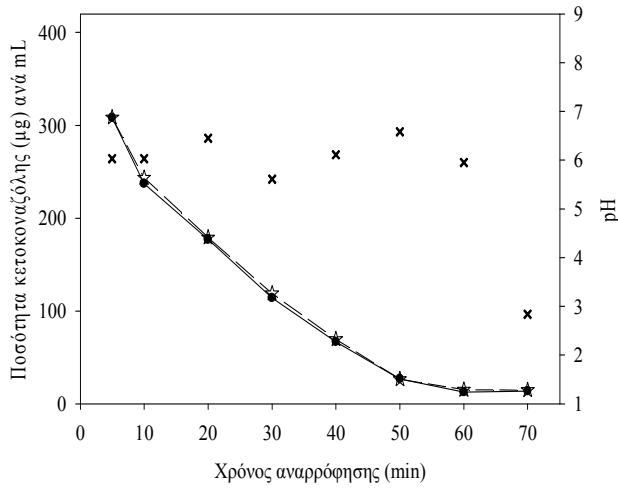


### KCZ-H

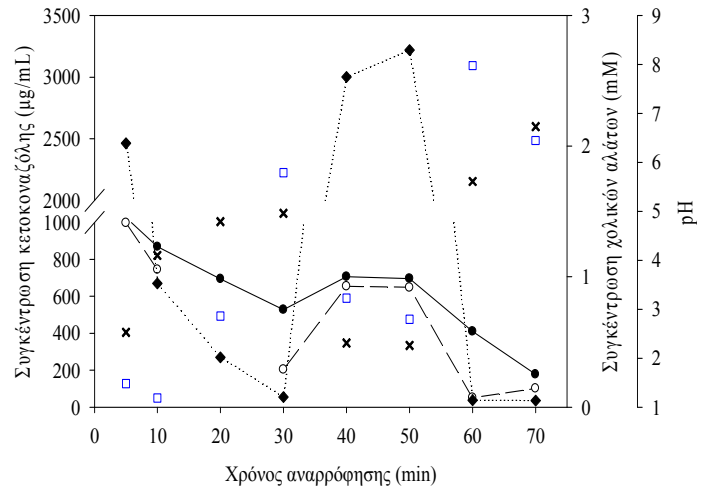
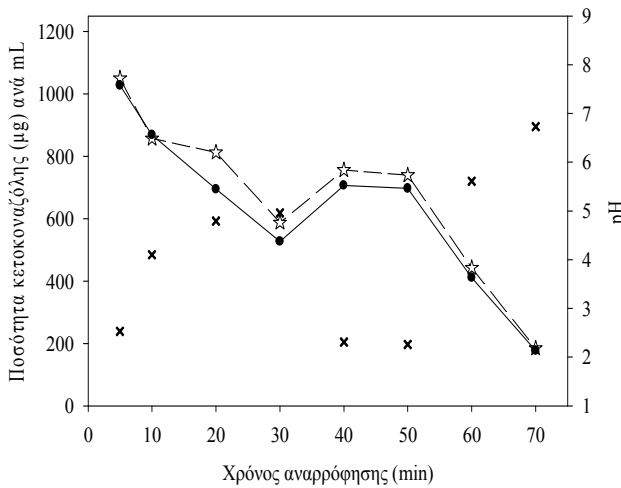


## Εθελοντής #5

### KCZ-L

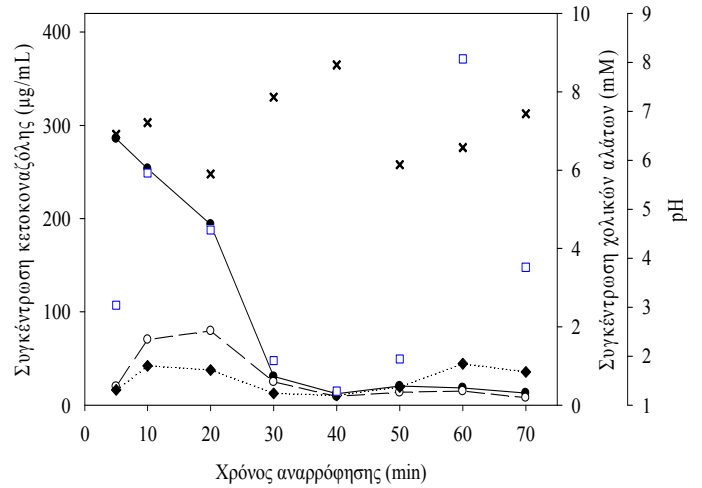
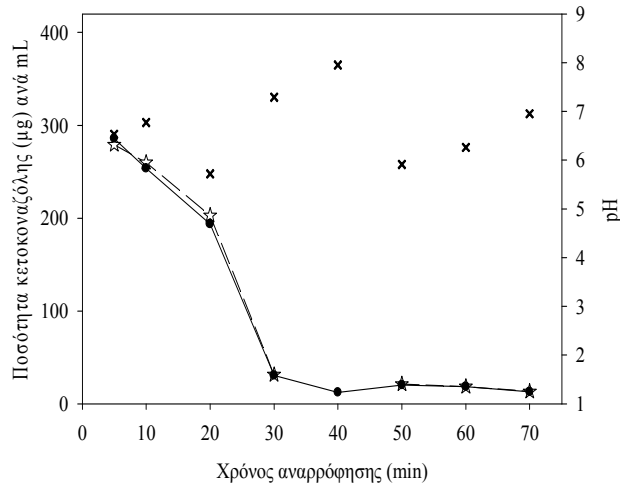


### KCZ-H

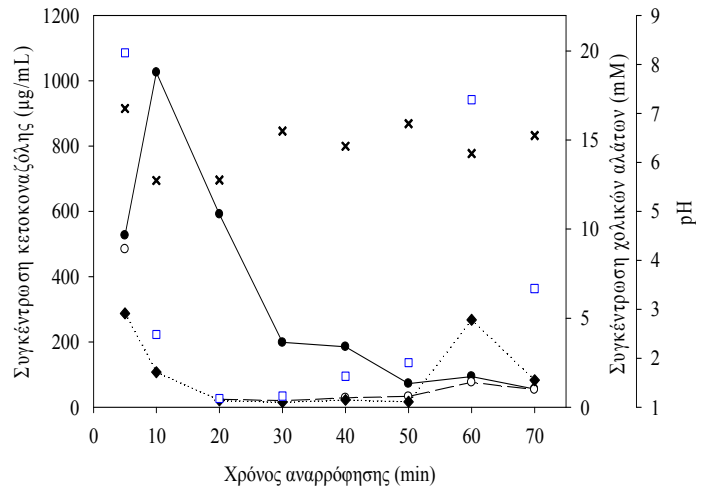
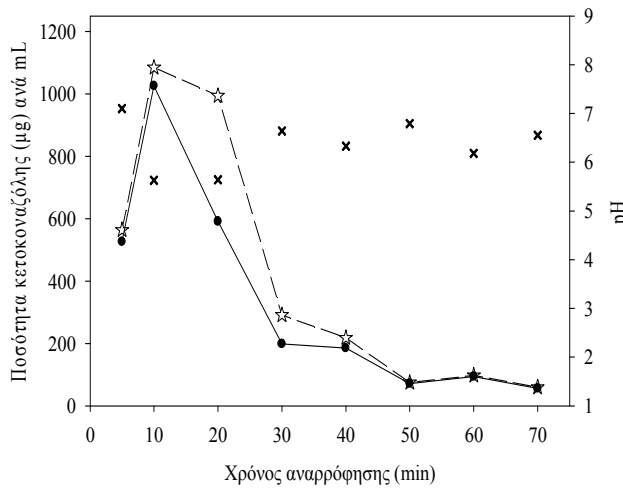


## Εθελοντής #6

### KCZ-L

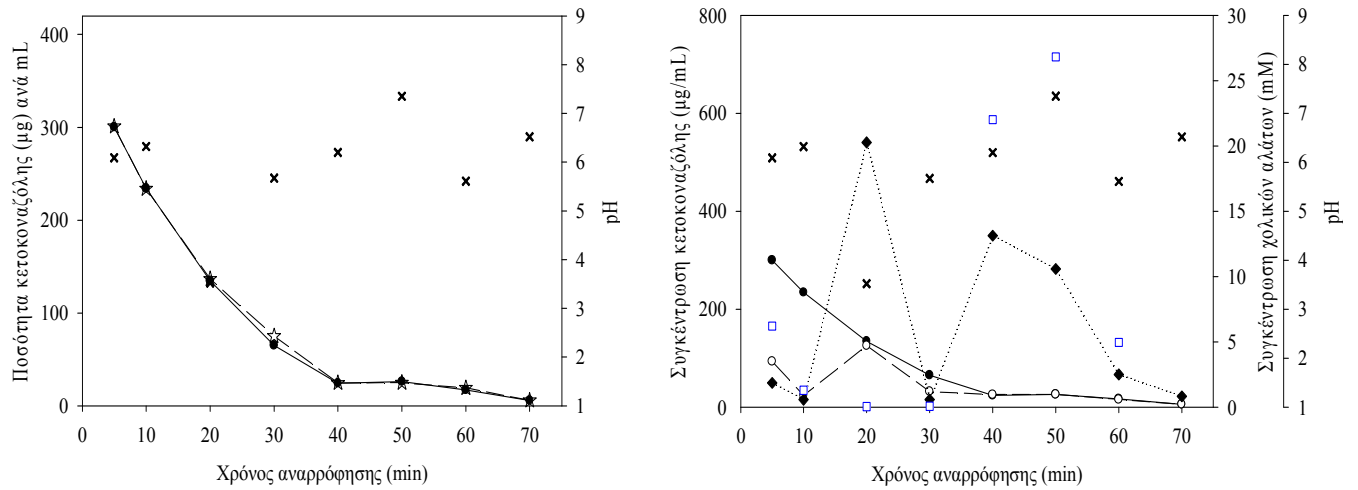


### KCZ-H

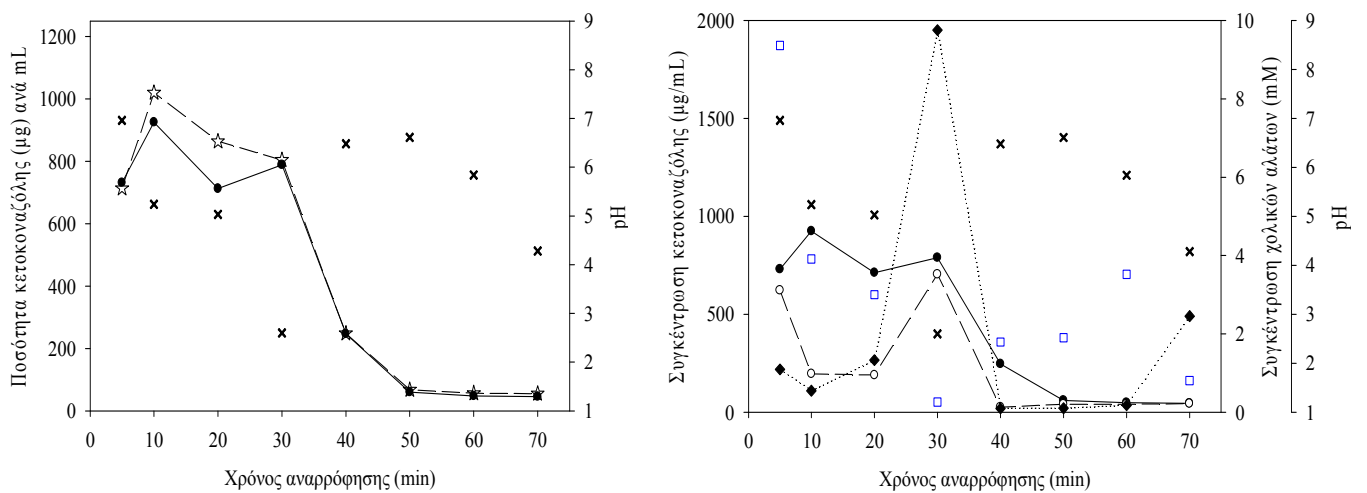


## Εθελοντής #7

### KCZ-L



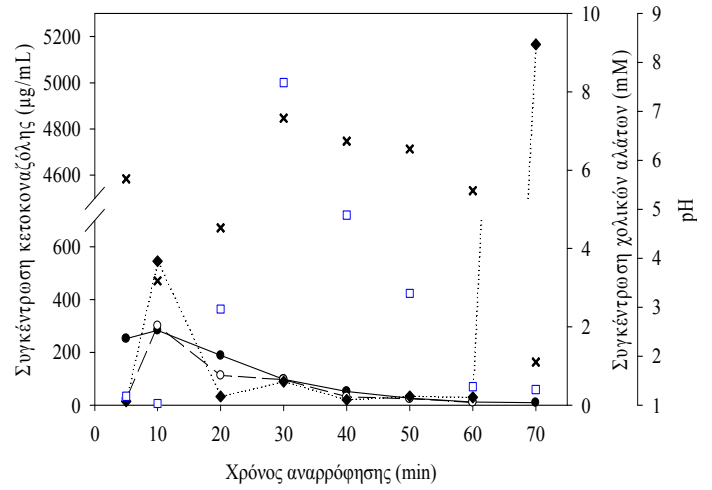
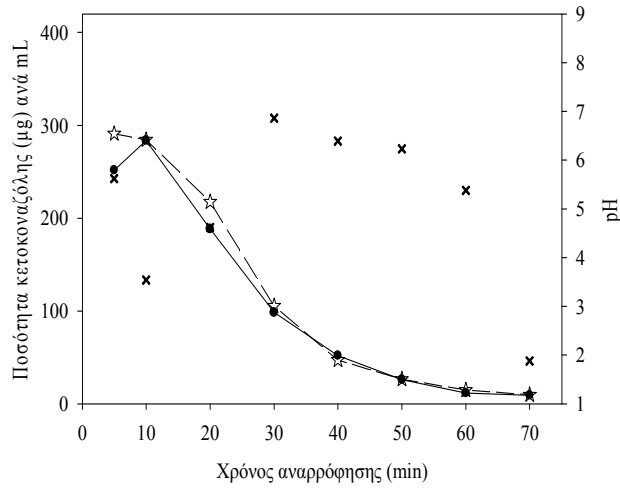
### KCZ-H



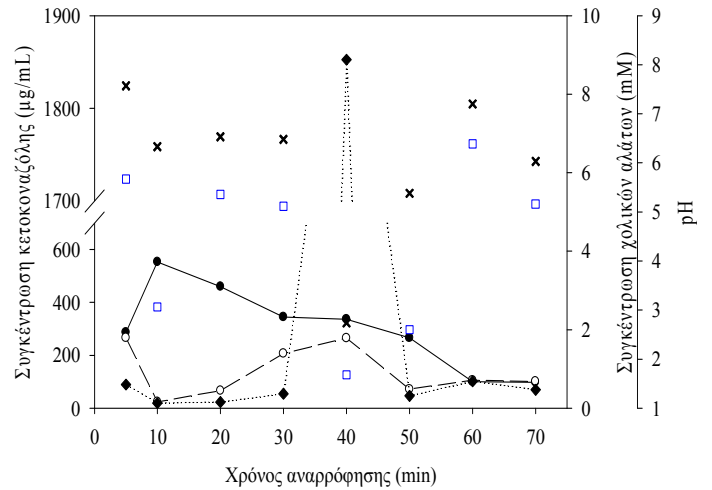
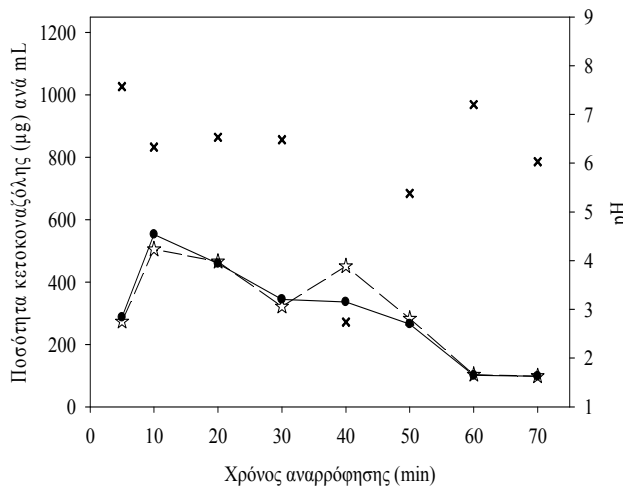


## Εθελοντής #8

### KCZ-L

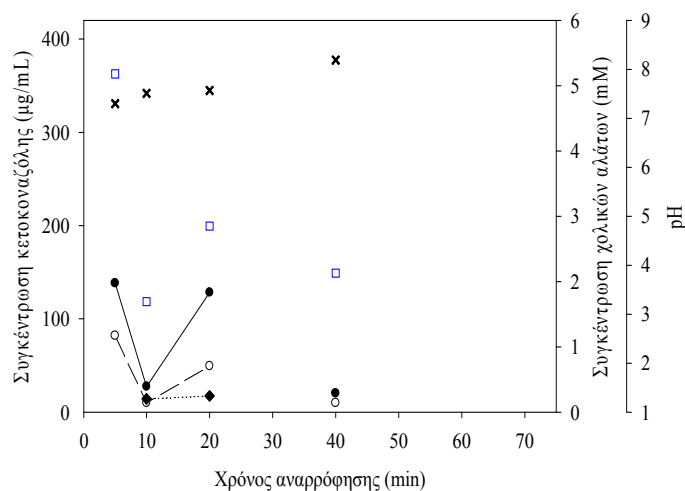
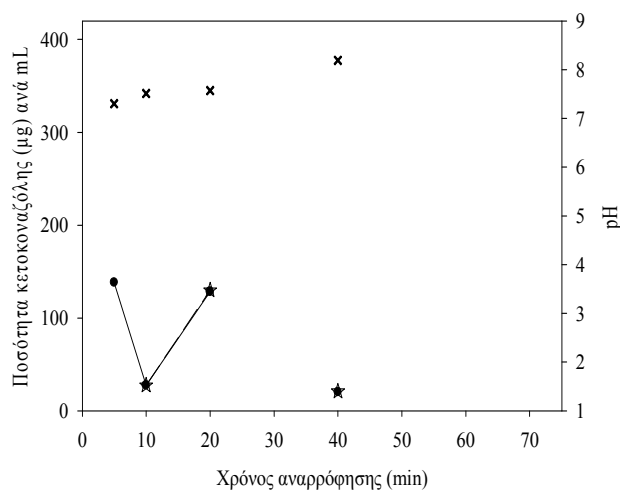


### KCZ-H

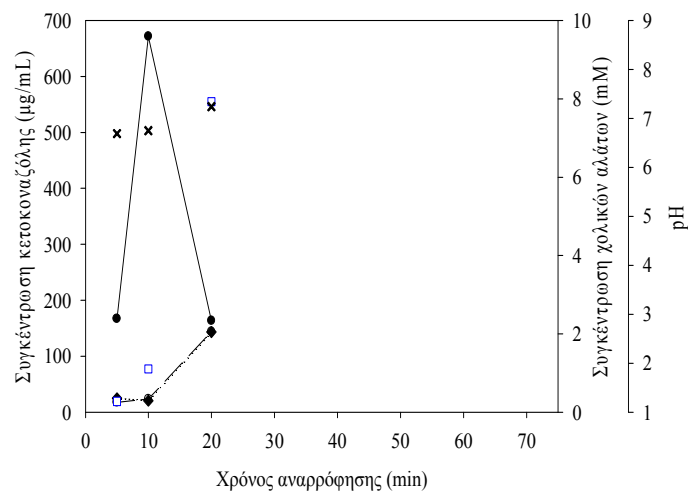
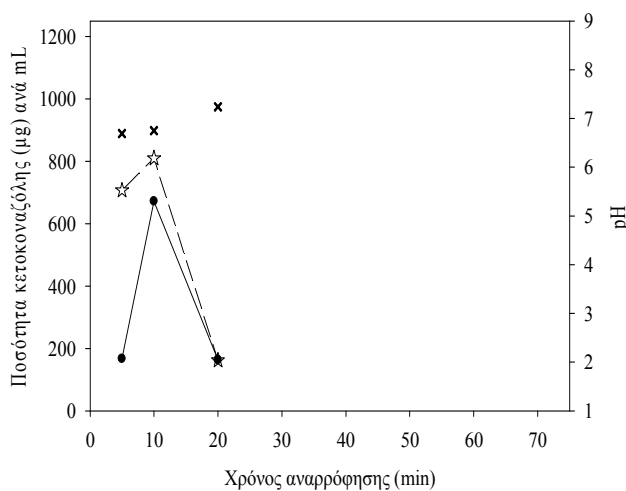


## Εθελοντής #9

### KCZ-L

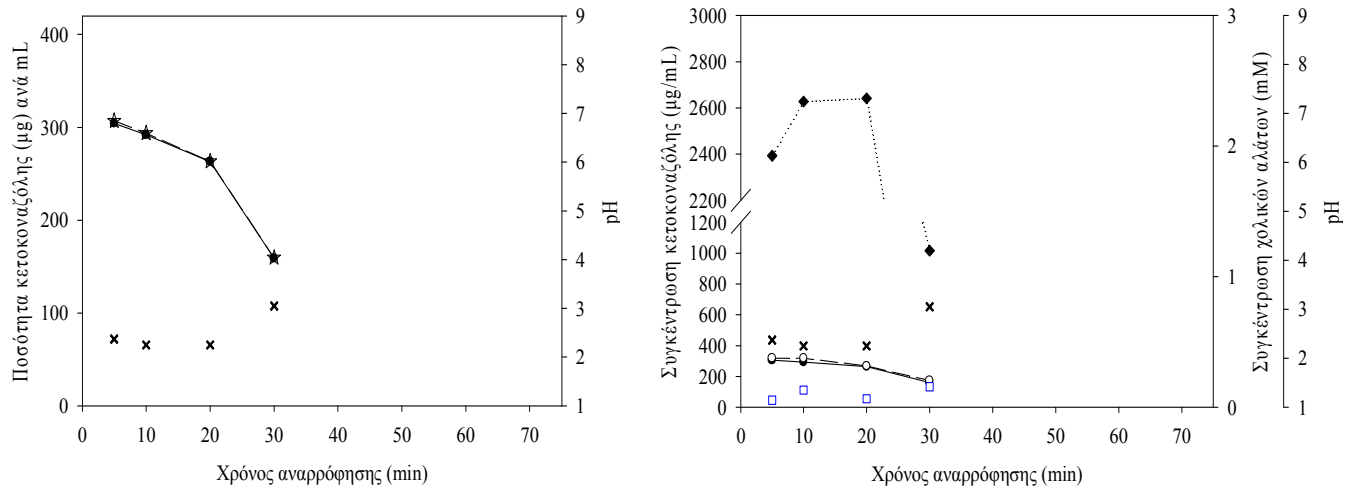


### KCZ-H

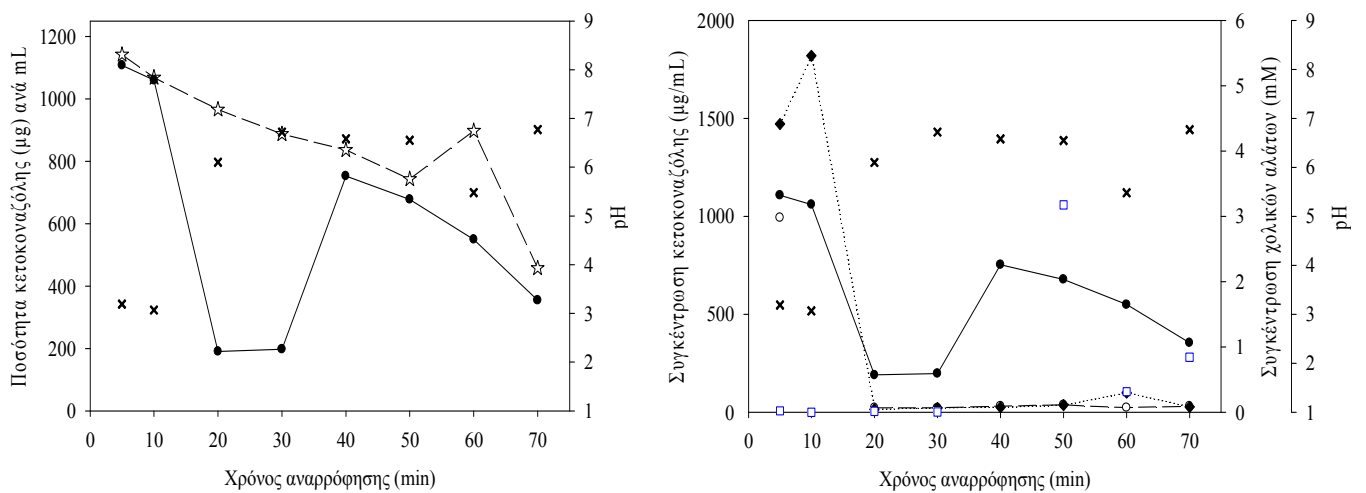


## Εθελοντής #10

### KCZ-L

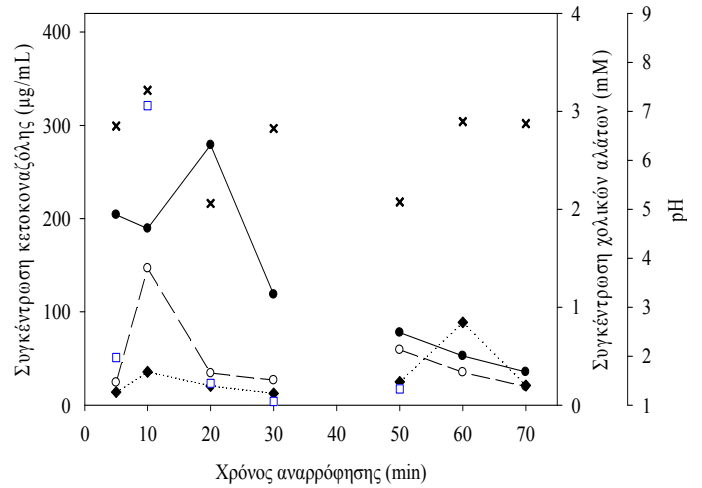
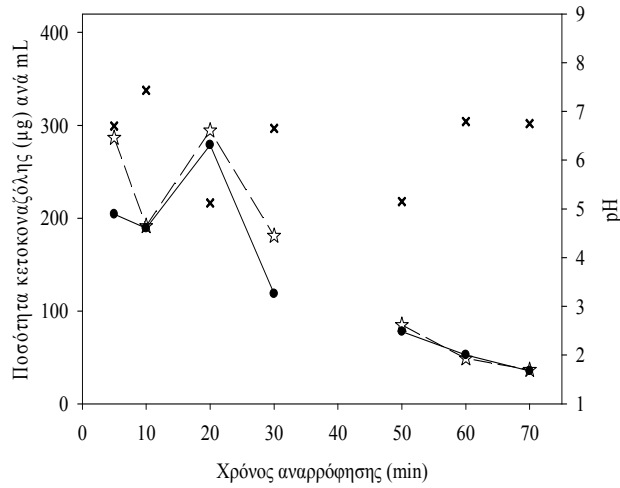


### KCZ-H

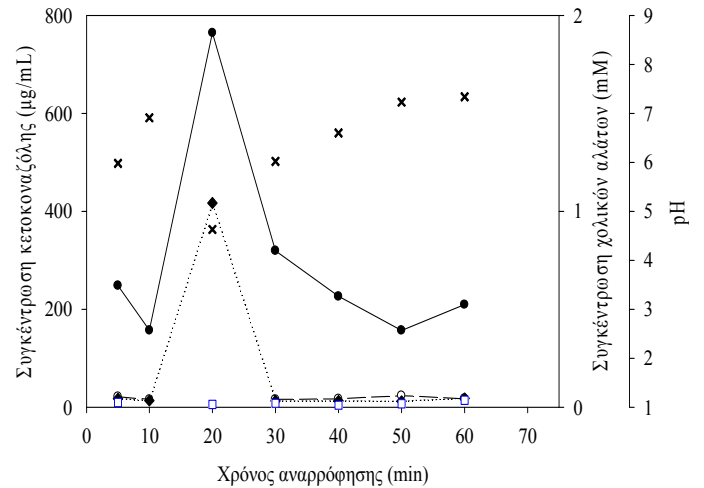
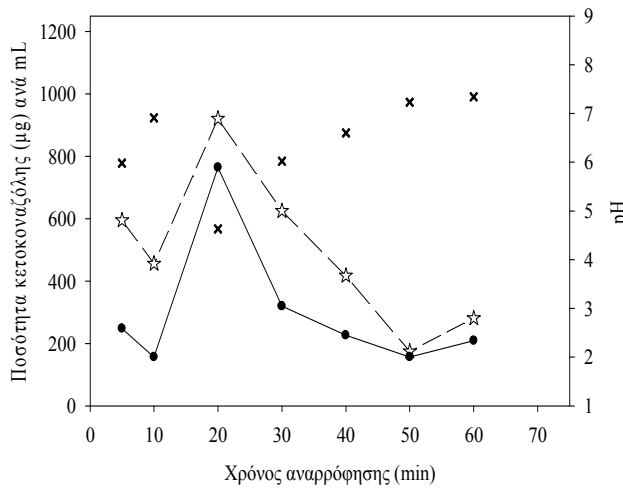


## Εθελοντής #11

### KCZ-L

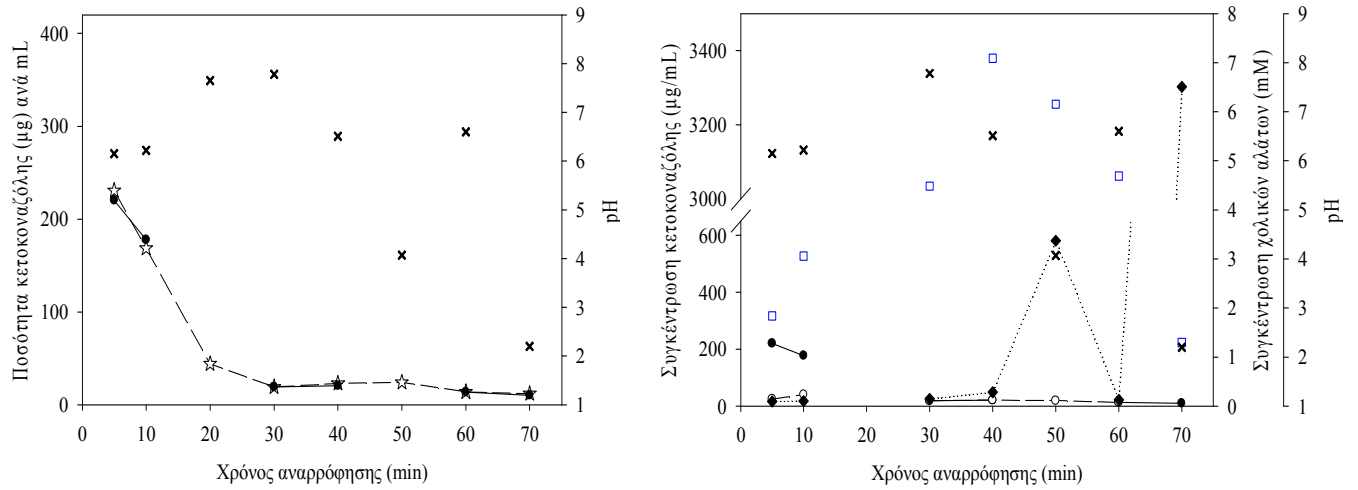


### KCZ-H

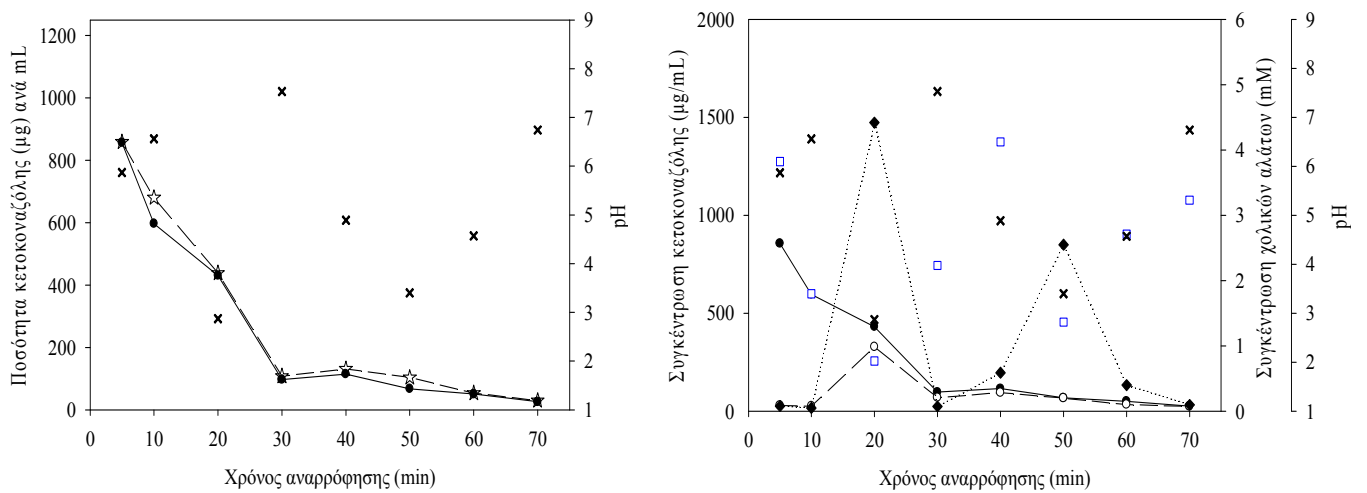


## Εθελοντής #12

### KCZ-L



### KCZ-H



### Π.10.3 Άλλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των μεμονωμένων δειγμάτων της κλινικής μελέτης

**Πίνακας Π10.3.1:** Συγκέντρωση φωσφατιδυλοχολίνης (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	ΔΜ	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0	0	0
30	ΔΜ	0	0	0	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0
40	ΔΜ	0	0	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0028	0	0
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0
70	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0	ΔΜ	0	0	0	0	0	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0
10	0	0	0	0	0	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,0089
20	0	0	0	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0	0	0
30	ΔΜ	0	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0	0
40	0	0	0	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0
50	ΔΜ	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0	0	0
60	ΔΜ	0	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0
70	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.2:** Συγκέντρωση φωσφατιδυλοχολίνης (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0	0	0	0	0	0	0	0	ΔΜ	0	0	0
10	0	0	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
30	0	0	0	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0051	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0,033
60	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0
70	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0	0	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0
<b>KCZ-H</b>												
5	0	0	0	0	0	0,0051	0	0	0	0	ΔΜ	0
10	0	0,014	0,0057	0	0	0	0,107	0	0	0	ΔΜ	0
20	0	0	0,0066	0	0	0	0,052	0	ΔΜ	0	0	0
30	0	0	0	0,0045	ΔΜ	0	0	0	ΔΜ	0	0	0
40	0	ΔΜ	0	0,100	0	0	0	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0
50	0	0,010	0	0	0,0041	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0052	ΔΜ	ΔΜ
60	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0
70	ΔΜ	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0	0	0	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.3:** Συγκέντρωση λυσοφωσφατιδυλογολίνης (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0	0,029	0,0064	0	0,017	0,396	0,038	0	0	0,605	0,010
10	0,198	0	0	0,0089	ΔΜ	0,0049	1,067	0,0089	0	0,0068	1,244	0,196
20	0,507	0	0,288	ΔΜ	0,375	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0069	0,180	0,716	0,393
30	ΔΜ	0,057	0,540	0	0,699	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0091	0,104
40	ΔΜ	0,011	1,126	ΔΜ	ΔΜ	0,670	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,293	0,0054	0,249
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,713
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,151	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,052
70	0,173	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,099	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0,013	ΔΜ	0,131	0,016	0,0079	0,170	0	ΔΜ	0	0,0058	ΔΜ	0,650
10	0,0064	0,699	0,060	0,0054	0,014	0,471	1,453	ΔΜ	0,023	ΔΜ	0,330	1,690
20	0,814	0,465	0,224	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0054	0,511	0,575	0,140
30	ΔΜ	0,025	0,656	0,530	ΔΜ	0,014	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,454	0,011	0
40	0,091	0,0088	0,521	0,064	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,017	0,241	ΔΜ	0,021
50	ΔΜ	0	ΔΜ	0,028	ΔΜ	0,0089	ΔΜ	ΔΜ	0	0,434	0,012	0,0062
60	ΔΜ	0,020	ΔΜ	0,0096	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,053
70	ΔΜ	ΔΜ	0,520	ΔΜ	0,0050	1,550	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0050

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.4:** Συγκέντρωση λυσοφωσφατιδυλογολίνης (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0	0	0,038	0,018	0,0170	0,054	0,308	0,0038	ΔΜ	0	0,015	0,042
10	0,0069	0,068	0,036	0,296	ΔΜ	0,782	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,614	0,361
20	0	0,258	0,222	0,0095	0,061	0,279	0	0,164	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
30	0	0,0093	0,026	0,296	ΔΜ	ΔΜ	0,0057	0,607	ΔΜ	0,0057	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	2,126	0,551	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,183
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,120	0,016	ΔΜ	0,609	ΔΜ	ΔΜ	0,0088	0,329
60	0,0048	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,052	0,364	0,480	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,061
70	0,012	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,050	0,331	0,076	0,012	ΔΜ	ΔΜ	0,110	0
<b>KCZ-H</b>												
5	0,784	0,182	0,112	0	0,012	0,797	0,715	0,624	0,0074	0	ΔΜ	0,114
10	0	0,454	1,073	0,0047	0	0,449	0,755	0,038	0,025	0	ΔΜ	0,171
20	0,266	0,218	ΔΜ	0,0045	0,024	0,0065	0,840	0,512	ΔΜ	0	0	0,0088
30	0,114	0	0,258	0,296	ΔΜ	0,019	0	0,434	ΔΜ	0,0059	0	0,0057
40	0,027	ΔΜ	0,014	1,107	0,010	0,120	0,202	0	ΔΜ	ΔΜ	0,012	0,313
50	0,0089	1,093	0,305	0,010	0,013	0,118	ΔΜ	0,062	ΔΜ	0,439	ΔΜ	ΔΜ
60	0,291	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,343	1,945	0,029	1,928	ΔΜ	0,015	ΔΜ	0,075
70	ΔΜ	ΔΜ	0,238	0,0071	ΔΜ	0,996	0,023	0,545	ΔΜ	0,107	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.5:** Συγκέντρωση λινελαϊκού οξέος (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0	0,136	0	0	0,0089	0,201	0,081	0	0	0,460	0,0041
10	0,127	0	0	0	ΔΜ	0	0,979	0	0	0	0,814	0,141
20	0,564	0	0,736	ΔΜ	0,625	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,291	0,496	0,556
30	ΔΜ	0,112	0,958	0	0,897	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,167
40	ΔΜ	0	1,542	ΔΜ	ΔΜ	0,343	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,129	0	0,254
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,828
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,484	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,357
70	0,156	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,158	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0,035	ΔΜ	0,359	0	0,018	0,262	0	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0,657
10	0	1,063	0,119	0	0,045	0,463	3,323	ΔΜ	0	ΔΜ	0,412	1,592
20	0,626	0,519	0,344	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,350	0,226	0,205
30	ΔΜ	0,036	1,938	0,275	ΔΜ	0,020	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,398	0	0
40	0,193	0	1,387	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,315	ΔΜ	0
50	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0041	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0,395	0	0
60	ΔΜ	0,034	ΔΜ	0,0082	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,088
70	ΔΜ	ΔΜ	0,451	ΔΜ	0,015	1,677	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,051

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.6:** Συγκέντρωση λινελαϊκού οξέος (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0	0	0	0	0,054	0,119	0,267	0	ΔΜ	0	0	0,093
10	0,0080	0,098	0,106	0,376	ΔΜ	0,844	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,399	0,249
20	0	0,354	0,405	0	0,241	0,271	0	0,070	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
30	0	0,018	0	0,548	ΔΜ	ΔΜ	0	0,451	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	2,610	0,290	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,374
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,405	0,027	ΔΜ	0,452	ΔΜ	ΔΜ	0	0,186
60	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,244	0,369	0,318	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,074
70	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,552	0,115	0	ΔΜ	ΔΜ	0,117	0,012
<b>KCZ-H</b>												
5	0,496	0,556	0,498	0	0	0,982	0,804	0,539	0	0	ΔΜ	0
10	0	0,715	1,374	0	0	0,245	0,447	0,067	0,069	0	ΔΜ	0,139
20	0,171	0,213	ΔΜ	0	0	0	0,455	0,285	ΔΜ	0	0	0
30	0,154	0	0,779	1,02	ΔΜ	0	0	0,279	ΔΜ	0	0	0,071
40	0,072	ΔΜ	0	0,749	0	0,094	0,388	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0,290
50	0,027	1,116	0,608	0,026	0	0,152	ΔΜ	0,077	ΔΜ	0,307	ΔΜ	ΔΜ
60	0,415	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,699	1,240	0,080	1,234	ΔΜ	0	ΔΜ	0,073
70	ΔΜ	ΔΜ	0,241	0,0072	ΔΜ	1,011	0	0,260	ΔΜ	0,106	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε



**Πίνακας Π10.3.7:** Συγκέντρωση παλμιτικού οξέος (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0	0,472	0,0052	0	0,048	0,118	0,095	0	0	0,266	0,099
10	0,046	0	0	0,0052	ΔΜ	0	0,463	0	0	0	0,300	0,075
20	0,378	0	0,608	ΔΜ	0,217	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,331	0,211	0,300
30	ΔΜ	0,077	0,501	0,0084	0,237	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0044	0,211
40	ΔΜ	0	1,327	ΔΜ	ΔΜ	0,194	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,478	0	0,248
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,174
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,309	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,283
70	0,100	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,209	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0,041	ΔΜ	0,341	0	0,030	0,306	0	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0,654
10	0	0,766	0,132	0	0,096	0,529	1,289	ΔΜ	0	ΔΜ	0,794	0,972
20	0,465	0,205	0,111	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,373	0,100	0,214
30	ΔΜ	0,063	1,261	0,131	ΔΜ	0,027	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,339	0,018	0
40	0,191	0	0,918	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,341	ΔΜ	0
50	ΔΜ	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0,020	ΔΜ	ΔΜ	0	0,478	0,013	0
60	ΔΜ	0,081	ΔΜ	0,016	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,153
70	ΔΜ	ΔΜ	0,054	ΔΜ	0,028	0,896	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,053

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.8:** Συγκέντρωση παλμιτικού οξέος (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0	0	0,0061	0	0,070	0,153	0,179	0,013	ΔΜ	0	0,023	0,077
10	0	0,060	0,097	0,112	ΔΜ	0,441	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,182	0,151
20	0	0,175	0,312	0	0,301	0,157	0	0,030	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
30	0	0,061	0	0,265	ΔΜ	ΔΜ	0,028	0,359	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,732	0,175	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,199
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,435	0,089	ΔΜ	0,377	ΔΜ	ΔΜ	0,015	0,029
60	0,018	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,432	0,354	0,161	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,086
70	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0067	0,680	0,284	0	ΔΜ	ΔΜ	0,166	0
<b>KCZ-H</b>												
5	0,223	0,588	0,487	0	0	1,213	0,729	0,211	0,0086	0	ΔΜ	0
10	0	0,248	0,243	0	0	0,172	0,232	0,087	0,075	0	ΔΜ	0,072
20	0,063	0,190	ΔΜ	0	0,026	0,020	0,188	0,201	ΔΜ	0	0	0
30	0,218	0	0,725	0,284	ΔΜ	0,024	0	0,145	ΔΜ	0,0086	0	0,055
40	0,095	ΔΜ	0	0,047	0	0,134	0,364	0	ΔΜ	ΔΜ	0,0047	0,170
50	0,060	0,562	0,235	0,040	0	0,210	ΔΜ	0,059	ΔΜ	0,173	ΔΜ	ΔΜ
60	0,519	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,642	0,808	0,213	0,267	ΔΜ	0,015	ΔΜ	0,027
70	ΔΜ	ΔΜ	0,023	0	ΔΜ	0,789	0,0057	0,127	ΔΜ	0,125	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.9:** Συγκέντρωση στεατικού οξέος (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0	0,041	0	0	0,0041	0,063	0,014	0	0	0,229	0,0078
10	0,0059	0	0	0	ΔΜ	0	0,073	0	0	0,014	0,333	0,040
20	0,050	0	0,124	ΔΜ	0,110	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,090	0,169	0,082
30	ΔΜ	0,020	0,080	0	0,188	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,049
40	ΔΜ	0	0,255	ΔΜ	ΔΜ	0,055	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,106	0	0,089
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,135
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,379	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,033
70	0,042	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,054	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0,011	ΔΜ	0,124	0	0,0064	0,079	0	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0,192
10	0	0,208	0,038	0	0,015	0,137	0,198	ΔΜ	0	ΔΜ	0,234	0,304
20	0,026	0,164	0,073	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,142	0,156	0,046
30	ΔΜ	0,010	0,276	0,018	ΔΜ	0,0070	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,073	0	0
40	0,017	0	0,185	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,130	ΔΜ	0
50	ΔΜ	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0070	ΔΜ	ΔΜ	0	0,198	0,0038	0
60	ΔΜ	0,013	ΔΜ	0,0044	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,046
70	ΔΜ	ΔΜ	0,017	ΔΜ	0,012	0,196	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,037

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.10:** Συγκέντρωση στεατικού οξέος (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0	0	0	0	0,0094	0,030	0,055	0	ΔΜ	0	0	0,011
10	0	0,012	0,022	0,058	ΔΜ	0,207	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,215	0,0081
20	0	0,099	0,078	0	0,081	0,062	0	0,0096	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
30	0	0,019	0	0,063	ΔΜ	ΔΜ	0,010	0,024	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,387	0,066	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,021
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,147	0,017	ΔΜ	0,039	ΔΜ	ΔΜ	0	0,104
60	0,0053	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,110	0,080	0,036	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,040
70	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,114	0,081	0	ΔΜ	ΔΜ	0,089	0
<b>KCZ-H</b>												
5	0,257	0,107	0,139	0	0	0,213	0,180	0,140	0	0	ΔΜ	0,018
10	0	0,054	0,098	0	0	0,052	0,127	0,013	0,014	0	ΔΜ	0,042
20	0,086	0,079	ΔΜ	0	0	0	0,160	0,043	ΔΜ	0	0	0
30	0,052	0	0,193	0,106	ΔΜ	0,0071	0	0,049	ΔΜ	0,0042	0	0,017
40	0,022	ΔΜ	0	0	0	0,040	0,114	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0,052
50	0,013	0,092	0,073	0,0091	0	0,074	ΔΜ	0,0086	ΔΜ	0,117	ΔΜ	ΔΜ
60	0,146	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,169	0,138	0,053	0,018	ΔΜ	0,0063	ΔΜ	0,0071
70	ΔΜ	ΔΜ	0,0087	0,0019	ΔΜ	0,161	0	0,096	ΔΜ	0,040	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.11:** Συγκέντρωση χοληστερόλης (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0,0069	0,057	0,014	0,0028	0,061	0,143	0,091	0,0059	0	0,468	0,035
10	0,091	0,0069	0,0075	0,010	ΔΜ	0,015	0,683	0,028	0,0029	0,0032	0,734	0,115
20	0,527	0	0,411	ΔΜ	0,418	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0068	0,318	0,481	0,323
30	ΔΜ	0,113	0,616	0,017	0,592	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0057	ΔΜ	0,020	0,113
40	ΔΜ	0,0058	1,328	ΔΜ	ΔΜ	0,339	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,349	0,018	0,170
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,411
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,186	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,249
70	0,289	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,163	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0,077	ΔΜ	0,271	0,0054	0,043	0,234	0	ΔΜ	0,0038	0,016	ΔΜ	0,578
10	0,026	0,950	0,104	0,0066	0,102	0,380	1,192	ΔΜ	0,015	ΔΜ	0,559	1,109
20	0,533	0,444	0,315	0,0055	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,017	0,610	0,320	0,153
30	ΔΜ	0,074	1,334	0,348	ΔΜ	0,064	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,582	0,055	0,0055
40	0,220	0,020	1,308	0,055	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,022	0,400	ΔΜ	0,017
50	ΔΜ	0,0096	ΔΜ	0,055	ΔΜ	0,027	ΔΜ	ΔΜ	0,0035	0,608	0,039	0,012
60	ΔΜ	0,056	ΔΜ	0,062	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,098
70	ΔΜ	ΔΜ	0,249	ΔΜ	0,106	1,530	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,084

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.12:** Συγκέντρωση χοληστερόλης (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0,0043	0	0,024	0,017	0,051	0,151	0,162	0,015	ΔΜ	0,0073	0,031	0,054
10	0,013	0,102	0,092	0,263	ΔΜ	0,759	ΔΜ	0,0033	ΔΜ	0,0061	0,379	0,180
20	0	0,348	0,289	0,024	0,203	0,325	0,0051	0,079	ΔΜ	0,0080	ΔΜ	ΔΜ
30	0,0025	0,098	0,030	0,357	ΔΜ	ΔΜ	0,038	0,401	ΔΜ	0,023	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,569	0,338	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,169
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,412	0,074	ΔΜ	0,501	ΔΜ	ΔΜ	0,024	0,175
60	0,021	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,409	0,312	0,465	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,075
70	0,020	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,061	0,523	0,199	0,023	ΔΜ	ΔΜ	0,189	0,015
<b>KCZ-H</b>												
5	0,340	0,373	0,304	0,0020	0,011	0,942	0,601	0,370	0,019	0,0024	ΔΜ	0,0037
10	0,0037	0,663	0,683	0,011	0,0080	0,251	0,336	0,055	0,043	0,0021	ΔΜ	0,111
20	0,110	0,217	ΔΜ	0,0091	0,037	0,013	0,315	0,302	ΔΜ	0,0037	0,0050	0,0014
30	0,128	0,0042	0,440	0,496	ΔΜ	0,045	0,0076	0,208	ΔΜ	0,0095	0,0063	0,060
40	0,076	ΔΜ	0,019	0,773	0,042	0,080	0,218	0,0057	ΔΜ	ΔΜ	0,013	0,185
50	0,034	0,789	0,314	0,022	0,038	0,149	ΔΜ	0,069	ΔΜ	0,343	ΔΜ	ΔΜ
60	0,348	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,730	1,122	0,155	0,823	ΔΜ	0,028	ΔΜ	0,063
70	ΔΜ	ΔΜ	0,159	0,013	ΔΜ	0,855	0,041	0,362	ΔΜ	0,165	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.13:** Συγκέντρωση μονογλυκεριδίου (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0	0,0080	0	0	0,0098	0,0080	0,0082	0	0	0,028	0
10	0,0049	0	0	0	ΔΜ	0	0,014	0	0	0	0,046	0,0049
20	0,016	0	0,081	ΔΜ	0,021	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,0065	0,158	0,0082
30	ΔΜ	0,013	0,085	0	0,036	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,0062
40	ΔΜ	0	0,184	ΔΜ	ΔΜ	0,035	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,069	0	0,0093
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,076
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,054	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0062
70	0,027	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0088	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0	ΔΜ	0,011	0	0,0060	0,033	0	ΔΜ	0	0	ΔΜ	0,045
10	0	0,151	0,0065	0	0,0075	0,055	0,020	ΔΜ	0	ΔΜ	0,020	0,042
20	0,018	0,014	0,023	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,0097	0,0030	0,0047
30	ΔΜ	0,0030	0,142	0,0047	ΔΜ	0,0035	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,010	0,0039	0
40	0,0094	0	0,153	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,027	ΔΜ	0
50	ΔΜ	0	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0031	ΔΜ	ΔΜ	0	0,016	0,0027	0
60	ΔΜ	0,0026	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0
70	ΔΜ	ΔΜ	0,017	ΔΜ	0,0048	0,183	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.14:** Συγκέντρωση μονογλυκεριδίου (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0	0	0	0	0	0,021	0,0032	0	ΔΜ	0	0,0026	0
10	0	0,0081	0,0093	0,0060	ΔΜ	0,187	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,033	0,0054
20	0	0,0081	0,077	0	0,0098	0,082	0	0,010	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
30	0	0,0084	0	0,021	ΔΜ	ΔΜ	0	0,031	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,048	0,011	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0078
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,019	0,0045	ΔΜ	0,017	ΔΜ	ΔΜ	0	0,0071
60	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,063	0	0,0084	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0053
70	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,059	0	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0
<b>KCZ-H</b>												
5	0,016	0,079	0,084	0	0	0,097	0,0069	0,045	0	0	ΔΜ	0,0051
10	0	0,038	0,055	0	0	0,013	0,011	0,0047	0,0095	0	ΔΜ	0,0059
20	0,012	0,010	ΔΜ	0	0	0	0,014	0,011	ΔΜ	0	0	0
30	0,0067	0	0,084	0,036	ΔΜ	0,0050	0	0,021	ΔΜ	0,0027	0	0,0038
40	0,0028	ΔΜ	0	0,018	0	0,010	0,0033	0	ΔΜ	ΔΜ	0	0,0049
50	0,0026	0,077	0,013	0,0038	0	0,030	ΔΜ	0,0062	ΔΜ	0,026	ΔΜ	ΔΜ
60	0,0063	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,039	0,128	0,0040	0,036	ΔΜ	0,0041	ΔΜ	0,0048
70	ΔΜ	ΔΜ	0,012	0	ΔΜ	0,116	0	0,018	ΔΜ	0,034	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.15:** Συνολική συγκέντρωση φωσφατιδυλογολίνης και λυσοφωσφατιδυλογολίνης (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0	0,029	0,0064	0	0,017	0,396	0,038	0	0	0,605	0,010
10	0,198	0	0	0,0089	ΔΜ	0,0049	1,067	0,0089	0	0,0068	1,244	0,196
20	0,507	0	0,288	ΔΜ	0,375	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0069	0,180	0,716	0,393
30	ΔΜ	0,057	0,540	0	0,700	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0091	0,104
40	ΔΜ	0,011	1,126	ΔΜ	ΔΜ	0,670	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,296	0,0054	0,249
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,713
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,151	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,052
70	0,173	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,099	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0,0129	ΔΜ	0,131	0,016	0,0079	0,170	0	ΔΜ	0	0,0058	ΔΜ	0,650
10	0,0064	0,6989	0,060	0,0054	0,014	0,471	1,453	ΔΜ	0,023	ΔΜ	0,330	1,699
20	0,8141	0,4654	0,224	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0054	0,511	0,575	0,140
30	ΔΜ	0,0252	0,656	0,530	ΔΜ	0,014	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,454	0,011	0
40	0,0914	0,0088	0,521	0,064	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,017	0,241	ΔΜ	0,021
50	ΔΜ	0	ΔΜ	0,028	ΔΜ	0,0089	ΔΜ	ΔΜ	0	0,434	0,012	0,0063
60	ΔΜ	0,0202	ΔΜ	0,0096	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,053
70	ΔΜ	ΔΜ	0,520	ΔΜ	0,0050	1,550	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0050

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.16:** Συνολική συγκέντρωση φωσφατιδυλογολίνης και λυσοφωσφατιδυλογολίνης (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0	0	0,038	0,018	0,017	0,054	0,308	0,0038	ΔΜ	0	0,015	0,042
10	0,0068	0,068	0,036	0,296	ΔΜ	0,782	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,614	0,361
20	0	0,258	0,222	0,0095	0,061	0,279	0	0,164	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
30	0	0,0093	0,026	0,296	ΔΜ	ΔΜ	0,0057	0,607	ΔΜ	0,0057	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	2,131	0,551	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,183
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,120	0,016	ΔΜ	0,609	ΔΜ	ΔΜ	0,0088	0,362
60	0,0048	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,052	0,364	0,480	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,061
70	0,012	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,050	0,331	0,076	0,012	ΔΜ	ΔΜ	0,110	0
<b>KCZ-H</b>												
5	0,784	0,182	0,112	0	0,012	0,802	0,715	0,624	0,0074	0	ΔΜ	0,114
10	0	0,468	1,078	0,0047	0	0,449	0,862	0,038	0,025	0	ΔΜ	0,171
20	0,266	0,218	ΔΜ	0,0045	0,024	0,0065	0,893	0,512	ΔΜ	0	0	0,0088
30	0,114	0	0,258	0,301	ΔΜ	0,019	0	0,434	ΔΜ	0,0059	0	0,0057
40	0,027	ΔΜ	0,014	1,207	0,010	0,120	0,202	0	ΔΜ	ΔΜ	0,012	0,313
50	0,0089	1,104	0,305	0,010	0,017	0,118	ΔΜ	0,062	ΔΜ	0,444	ΔΜ	ΔΜ
60	0,291	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,343	1,945	0,029	1,929	ΔΜ	0,015	ΔΜ	0,075
70	ΔΜ	ΔΜ	0,238	0,0071	ΔΜ	0,996	0,023	0,544	ΔΜ	0,107	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.17:** Συνολική συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων (mM) [λινελαϊκό, παλμιτικό και στεατικό οξύ] στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0	0,648	0,0052	0	0,061	0,382	0,189	0	0	0,954	0,110
10	0,178	0	0	0,0052	ΔΜ	0	1,515	0	0	0,014	1,447	0,257
20	0,991	0	1,468	ΔΜ	0,952	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,712	0,875	0,932
30	ΔΜ	0,209	1,539	0,0084	1,322	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0044	0,426
40	ΔΜ	0	3,124	ΔΜ	ΔΜ	0,592	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,713	0	0,591
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,137
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	2,171	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,673
70	0,298	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,421	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0,087	ΔΜ	0,823	0	0,054	0,647	0	ΔΜ	0	0	ΔΜ	1,502
10	0	2,037	0,289	0	0,157	1,128	4,810	ΔΜ	0	ΔΜ	1,441	2,869
20	1,116	0,888	0,528	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,866	0,482	0,465
30	ΔΜ	0,109	3,476	0,424	ΔΜ	0,055	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,811	0,018	0
40	0,401	0	2,490	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0	0,786	ΔΜ	0
50	ΔΜ	0	ΔΜ	0,0041	ΔΜ	0,027	ΔΜ	ΔΜ	0	1,071	0,017	0
60	ΔΜ	0,128	ΔΜ	0,028	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,287
70	ΔΜ	ΔΜ	0,522	ΔΜ	0,055	2,769	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,141

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.18:** Συνολική συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων (mM) [λινελαϊκό, παλμιτικό και στεατικό οξύ] στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0	0	0,0061	0	0,133	0,302	0,501	0,013	ΔΜ	0	0,022	0,181
10	0,0080	0,170	0,224	0,545	ΔΜ	1,492	ΔΜ	0	ΔΜ	0	0,797	0,408
20	0	0,627	0,795	0	0,623	0,489	0	0,110	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
30	0	0,097	0	0,876	ΔΜ	ΔΜ	0,039	0,834	ΔΜ	0	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	4,728	0,532	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,594
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,987	0,134	ΔΜ	0,868	ΔΜ	ΔΜ	0,015	0,319
60	0,024	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,786	0,803	0,516	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,200
70	0	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,0067	1,346	0,480	0,0000	ΔΜ	ΔΜ	0,372	0,012
<b>KCZ-H</b>												
5	0,976	1,250	1,124	0	0	2,408	1,713	0,890	0,0086	0	ΔΜ	0,018
10	0	1,018	1,715	0	0	0,469	0,806	0,167	0,158	0	ΔΜ	0,253
20	0,319	0,482	ΔΜ	0	0,026	0,020	0,804	0,529	ΔΜ	0	0	0
30	0,425	0	1,696	1,410	ΔΜ	0,031	0	0,473	ΔΜ	0,013	0	0,143
40	0,189	ΔΜ	0	0,796	0	0,269	0,866	0	ΔΜ	ΔΜ	0,0047	0,512
50	0,100	1,770	0,916	0,075	0	0,436	ΔΜ	0,145	ΔΜ	0,598	ΔΜ	ΔΜ
60	1,080	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,510	2,187	0,345	1,519	ΔΜ	0,022	ΔΜ	0,108
70	ΔΜ	ΔΜ	0,273	0,0091	ΔΜ	1,961	0,0057	0,483	ΔΜ	0,270	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.19:** Συνολική συγκέντρωση λιπών (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	ΔΜ	0,007	0,771	0,026	0,003	0,149	0,933	0,327	0,006	0	2,055	0,156
10	0,472	0,007	0,008	0,025	ΔΜ	0,020	3,278	0,037	0,003	0,037	3,472	0,573
20	2,041	0	2,247	ΔΜ	1,767	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,014	1,216	2,231	1,656
30	ΔΜ	0,392	2,780	0,025	2,649	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,006	ΔΜ	0,034	0,650
40	ΔΜ	0,017	5,763	ΔΜ	ΔΜ	1,652	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	4,427	0,024	1,019
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	2,337
60	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	2,692	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0
70	0,799	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,692	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	0,181	ΔΜ	1,291	0,022	0,111	1,084	0	ΔΜ	0,004	0,022	ΔΜ	2,770
10	0,033	3,836	0,490	0,012	0,281	2,033	7,475	ΔΜ	0,038	ΔΜ	2,350	5,719
20	2,482	1,827	1,116	0,006	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,022	1,997	1,397	0,763
30	ΔΜ	0,219	5,660	1,313	ΔΜ	0,136	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,885	0,088	0,006
40	0,722	0,029	4,472	0,120	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,038	1,454	ΔΜ	0,038
50	ΔΜ	0,010	ΔΜ	0,087	ΔΜ	0,067	ΔΜ	ΔΜ	0,003	2,128	0,070	0,018
60	ΔΜ	0,213	ΔΜ	0,101	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,442
70	ΔΜ	ΔΜ	1,315	ΔΜ	0,171	6,033	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,230

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.20:** Συνολική συγκέντρωση λιπών (mM) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0,004	0	0,067	0,032	0,201	0,528	0,975	0,031	ΔΜ	0,007	0,071	0,277
10	0,028	0,347	0,360	1,110	ΔΜ	3,220	ΔΜ	0,003	ΔΜ	0,006	1,822	0,955
20	0	1,241	1,383	0,034	0,896	1,175	0,005	0,362	ΔΜ	0,008	ΔΜ	ΔΜ
30	0,002	0,212	0,057	1,550	ΔΜ	ΔΜ	0,083	1,873	ΔΜ	0,029	ΔΜ	ΔΜ
40	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	8,476	1,431	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0
50	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,538	0,232	ΔΜ	1,995	ΔΜ	ΔΜ	0,048	0,864
60	0,049	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,309	1,479	1,482	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,341
70	0,032	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,118	2,259	0,755	0,035	ΔΜ	ΔΜ	0,671	0,026
<b>KCZ-H</b>												
5	2,121	1,885	1,624	0,002	0,023	4,251	3,036	1,929	0,036	0,002	ΔΜ	0,141
10	0,004	2,187	3,531	0,016	0,008	1,188	2,020	0,265	0,235	0,002	ΔΜ	0,541
20	0,707	0,928	ΔΜ	0,014	0,087	0,039	2,029	1,353	ΔΜ	0,004	0,005	0,010
30	0,673	0,004	2,479	2,243	ΔΜ	0,100	0,008	1,136	ΔΜ	0,031	0,006	0,212
40	0,295	ΔΜ	0,033	2,800	0,053	0,483	1,290	0,006	ΔΜ	ΔΜ	0,030	1,024
50	0,145	3,740	1,552	0,111	0,055	0,733	ΔΜ	0,282	ΔΜ	1,411	ΔΜ	ΔΜ
60	1,732	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	2,629	5,382	0,539	4,307	ΔΜ	0,069	ΔΜ	0,254
70	ΔΜ	ΔΜ	0,687	0,029	ΔΜ	3,929	0,070	1,408	ΔΜ	0,576	ΔΜ	ΔΜ

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε



**Πίνακας Π10.3.21:** Ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο (mg/mL) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση DPD-L και DPD-H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>DPD-L</b>												
5	1,041	0,341	1,540	1,077	0,563	0,320	0,629	0,734	0,242	0,615	1,359	0,360
10	0,600	0,511	0,432	0,239	ΔΜ	0,794	1,163	0,459	0,264	0,932	1,517	0,773
20	1,243	0,265	1,317	ΔΜ	0,294	0,670	ΔΜ	0,686	0,310	1,101	0,962	1,344
30	1,224	0,750	1,770	1,493	0,291	1,804	ΔΜ	1,103	0,306	1,206	0,423	0,959
40	0,923	0,579	2,493	1,614	ΔΜ	1,071	ΔΜ	ΔΜ	0,400	2,383	0,531	1,151
50	ΔΜ	1,000	2,929	1,173	ΔΜ	1,434	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,690
60	ΔΜ	ΔΜ	2,636	ΔΜ	2,908	1,570	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,788	0,783
70	2,051	ΔΜ	2,247	ΔΜ	ΔΜ	2,303	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ
<b>DPD-H</b>												
5	2,908	0,924	0,777	0,275	0,496	1,690	0,642	0,831	0,345	0,557	1,882	1,945
10	0,709	3,014	1,977	0,737	1,153	1,858	2,344	0,835	0,496	1,744	2,317	2,086
20	2,618	1,254	1,238	0,231	1,710	1,144	2,221	1,062	ΔΜ	1,886	1,110	1,375
30	1,361	1,730	1,421	0,488	2,151	2,019	1,305	1,109	ΔΜ	1,849	0,505	1,114
40	1,624	1,008	3,364	0,251	2,468	1,621	1,940	ΔΜ	0,654	1,851	ΔΜ	1,110
50	1,567	0,873	2,290	0,753	ΔΜ	2,658	ΔΜ	1,520	0,500	1,864	1,293	1,183
60	ΔΜ	1,186	ΔΜ	4,847	ΔΜ	1,801	1,918	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,959
70	3,330	1,425	1,834	1,663	3,218	2,139	ΔΜ	2,626	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,095

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε

**Πίνακας Π10.3.22:** Ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο (mg/mL) στα δείγματα που αναρροφήθηκαν από τον εντερικό αυλό υγιών εθελοντών (n=12) μετά τη χορήγηση KCZ-L και KCZ -H, αντίστοιχα.

Χρόνος αναρρόφησης (min)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
<b>KCZ-L</b>												
5	0,684	0,591	0,611	0,619	0,310	0,599	1,071	0,535	2,163	0,378	0,640	0,578
10	1,323	0,915	2,080	0,298	0,699	1,726	0,629	0,355	1,760	0,387	0,990	0,638
20	0,678	0,782	0,607	0,401	0,318	0,350	1,321	0,869	0,959	0,295	ΔΜ	0,546
30	0,291	0,884	0,709	1,164	0,746	1,293	1,087	1,349	ΔΜ	1,233	ΔΜ	0,836
40	1,733	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	0,908	1,455	2,437	0,819	1,380	ΔΜ	ΔΜ	1,148
50	1,799	ΔΜ	ΔΜ	1,793	1,722	0,753	3,747	1,141	ΔΜ	ΔΜ	2,752	0,701
60	0,456	1,544	ΔΜ	ΔΜ	0,557	0,884	1,255	0,917	ΔΜ	ΔΜ	2,506	0,802
70	0,477	ΔΜ	ΔΜ	ΔΜ	1,584	0,923	1,573	0,989	ΔΜ	ΔΜ	2,196	ΔΜ
<b>KCZ-H</b>												
5	2,612	4,890	2,473	1,054	0,393	2,149	3,036	1,144	1,712	0,590	ΔΜ	1,391
10	1,465	2,950	0,854	0,389	1,220	1,184	1,450	0,999	1,464	1,061	ΔΜ	1,132
20	1,259	1,513	2,236	0,631	0,785	0,449	1,087	1,482	2,723	1,313	2,116	1,145
30	1,535	1,083	1,742	2,226	1,488	1,568	0,573	1,343	ΔΜ	2,413	2,344	1,041
40	1,366	1,182	2,633	0,635	0,476	0,852	1,330	1,229	ΔΜ	1,975	0,880	1,662
50	1,182	2,839	1,599	0,623	2,098	0,943	1,201	0,936	ΔΜ	1,920	ΔΜ	ΔΜ
60	2,358	1,056	0,951	ΔΜ	0,927	3,946	1,952	1,434	ΔΜ	1,120	1,113	1,347
70	1,938	ΔΜ	1,234	0,559	1,528	0,769	1,261	1,229	ΔΜ	1,556	ΔΜ	1,262

ΔΜ: Δεν μετρήθηκε



#### Π.10.4 Μεμονωμένα δεδομένα για *in vitro* καθίζηση και υπερκορεσμό

##### Π10.4.1 Όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε DPD-L

**Πίνακας Π10.4.1:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης DPD-L από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,0155	0,0053	0,0171	0,0127	0,0064
15-30	0,0075	0,0183	0,0151	0,0136	0,0056
30-45	0,027	-0,007	-0,002	0,006	0,018
45-60	0,0089	0,0056	0,0007	0,0051	0,0041
60-75	0,005	0,021	-0,001	0,008	0,012

**Πίνακας Π10.4.2:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης DPD-L από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	5,04	4,47	4,74	4,75	0,29
15-30	3,20	2,59	2,85	2,88	0,30
30-45	1,48	1,19	1,40	1,36	0,15
45-60	0,29	0,07	0,16	0,17	0,11
60-75	-0,19	-0,45	-0,40	-0,34	0,14

**Πίνακας Π10.4.3:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης DPD-L από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	1,14
15-30	1,55
30-45	1,06
45-60	0,03
60-75	-0,40

**Πίνακας Π10.4.4:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης DPD-L από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,645	0,608	0,627	0,627	0,018
15-30	0,392	0,290	0,338	0,340	0,051
30-45	0,170	0,060	0,141	0,124	0,057
45-60	0,205	0,037	0,114	0,119	0,084
60-75	0,26	-0,08	0,01	0,06	0,18

Π10.4.2 Όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε DPD-H

**Πίνακας Π10.4.5:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης DPD-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in\ vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,057	0,127	0,095	0,093	0,035
15-30	0,027	-0,015	0,001	0,004	0,021
30-45	0,0317	0,0298	0,0247	0,0288	0,0036
45-60	-0,0003	0,0149	0,0011	0,0052	0,0084
60-75	0,002	0,018	0,000	0,007	0,010

**Πίνακας Π10.4.6:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης DPD-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in\ vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	12,82	13,88	14,58	13,76	0,89
15-30	10,10	11,27	11,12	10,83	0,63
30-45	6,31	6,56	6,46	6,44	0,12
45-60	2,44	3,01	2,89	2,78	0,30
60-75	1,32	1,13	0,92	1,12	0,20

**Πίνακας Π10.4.7:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης DPD-H από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	0,17
15-30	0,36
30-45	0,99
45-60	2,01
60-75	0,71

**Πίνακας Π10.4.8:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης DPD-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,9151	0,9212	0,9247	0,9203	0,0049
15-30	0,8779	0,8895	0,8882	0,8852	0,0063
30-45	0,7284	0,7373	0,7336	0,7331	0,0045
45-60	0,125	0,248	0,225	0,199	0,065
60-75	0,265	0,199	0,111	0,192	0,077

### Π10.4.3 Όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε KCZ-L

**Πίνακας Π10.4.9:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-L από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in\ vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,097	0,059	0,093	0,083	0,021
15-30	0,085	0,053	0,041	0,060	0,023
30-45	0,069	0,026	0,023	0,039	0,026
45-60	0,079	0,016	0,032	0,042	0,033
60-75	0,036	0,022	0,087	0,048	0,034

**Πίνακας Π10.4.10:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-L από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in\ vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	9,50	9,89	9,32	9,57	0,29
15-30	5,71	5,97	5,98	5,88	0,15
30-45	2,934	2,826	2,928	2,896	0,061
45-60	0,881	0,863	0,987	0,910	0,067
60-75	0,12	0,31	0,18	0,20	0,10

**Πίνακας Π10.4.11:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-L από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	0,07
15-30	0,14
30-45	0,37
45-60	0,54
60-75	0,02

**Πίνακας Π10.4.12:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-L από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,8979	0,9015	0,8961	0,8985	0,0028
15-30	0,8308	0,8370	0,8373	0,8350	0,0037
30-45	0,6526	0,6428	0,6521	0,6492	0,0055
45-60	0,179	0,172	0,223	0,191	0,028
60-75	0,087	0,218	0,132	0,146	0,066

**Π10.4.4 Όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε KCZ-H**

i) Όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε FaSSIF-V2plus

**Πίνακας Π10.4.13:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,201	0,182	0,206	0,196	0,013
15-30	0,191	0,156	0,221	0,189	0,033
30-45	0,161	0,071	0,104	0,112	0,045
45-60	0,077	0,049	0,039	0,055	0,020
60-75	0,154	0,015	0,045	0,071	0,073

**Πίνακας Π10.4.14:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	26,03	27,04	25,29	26,12	0,88
15-30	17,79	18,47	16,66	17,64	0,91
30-45	8,96	10,57	10,37	9,96	0,88
45-60	4,54	4,75	5,07	4,79	0,27
60-75	2,2476	2,2612	2,2566	2,2551	0,0070

**Πίνακας Π10.4.15:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in\ vitro}^{inc}$
0-15	0,02
15-30	0,01
30-45	0,01
45-60	0,11
60-75	1,27

**Πίνακας Π10.4.16** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in\ vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,9622	0,9635	0,9611	0,9623	0,0012
15-30	0,9463	0,9481	0,9428	0,9457	0,0027
30-45	0,8981	0,9123	0,9108	0,9071	0,0078
45-60	0,7998	0,8071	0,8173	0,8080	0,0088
60-75	0,3020	0,3049	0,3039	0,3036	0,0015



ii) Όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε FaSSIF-V2

**Πίνακας Π10.4.17:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,651	0,621	0,645	0,639	0,016
15-30	0,451	0,451	0,481	0,468	0,015
30-45	0,103	0,132	0,130	0,122	0,016
45-60	0,0053	0,0239	0,0147	0,014	0,0093
60-75	0,037	0,043	0,020	0,033	0,012

**Πίνακας Π10.4.18:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	14,78	16,07	16,22	15,69	0,79
15-30	16,09	15,93	15,63	15,89	0,23
30-45	15,06	15,02	15,37	15,15	0,19
45-60	7,82	7,82	8,09	7,91	0,16
60-75	4,23	4,07	4,24	4,18	0,10

**Πίνακας Π10.4.19:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in\ vitro}^{inc}$
0-15	0,26
15-30	0,20
30-45	0,42
45-60	0,45
60-75	1,33

**Πίνακας Π10.4.20** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in\ vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,9203	0,9263	0,9270	0,9245	0,0037
15-30	0,9297	0,9290	0,9278	0,9288	0,0010
30-45	0,9113	0,9111	0,9130	0,9118	0,0010
45-60	0,8351	0,8352	0,8401	0,8368	0,0029
60-75	0,5552	0,5410	0,5563	0,5508	0,0086

iii) Όταν στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε FaSSIF

**Πίνακας Π10.4.21:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης KCZ-H από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,304	0,260	0,299	0,287	0,024
15-30	0,015	0,037	0,051	0,034	0,018
30-45	0,0241	0,0283	0,0252	0,0259	0,0022
45-60	0,0350	0,0347	0,0386	0,0361	0,0022
60-75	0,037	0,043	0,066	0,049	0,015

Π10.4.5 Όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε AZD-1

**Πίνακας Π10.4.22:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης AZD-1 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,210	0,221	0,190	0,207	0,016
15-30	0,1481	0,1507	0,1571	0,1520	0,0046
30-45	0,044	0,016	0,033	0,031	0,014
45-60	0,05	0,22	0,00	0,09	0,12
60-75	0,0267	0,0255	0,0354	0,0292	0,0054

**Πίνακας Π10.4.23:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης AZD-1 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	35,3	36,9	34,8	35,7	1,1
15-30	26,51	27,83	26,11	26,82	0,90
30-45	16,66	17,59	16,82	17,02	0,50
45-60	7,6	5,8	7,7	7,0	1,1
60-75	3,79	3,93	3,85	3,86	0,07

**Πίνακας Π10.4.24:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης AZD-1 από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	0,85
15-30	0,77
30-45	0,52
45-60	0,59
60-75	0,36

**Πίνακας Π10.4.25:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης AZD-1 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,9492	0,9513	0,9484	0,9497	0,0015
15-30	0,9357	0,9387	0,9348	0,9364	0,0020
30-45	0,9138	0,9182	0,9146	0,9155	0,0023
45-60	0,816	0,767	0,818	0,800	0,029
60-75	0,7162	0,7239	0,7197	0,7199	0,0039

*Π10.4.6 Όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε AZD-2*

**Πίνακας Π10.4.26:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης AZD-2 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,042	0,108	0,092	0,081	0,034
15-30	0,045	0,108	0,005	0,053	0,052
30-45	0,025	0,052	0,041	0,039	0,014
45-60	-0,003	0,030	0,050	0,026	0,027
60-75	0,027	0,003	0,053	0,028	0,025

**Πίνακας Π10.4.27:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης AZD-2 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	24,0	26,4	28,0	26,1	2,0
15-30	16,11	14,16	14,88	15,05	0,99
30-45	9,75	9,55	9,38	9,56	0,18
45-60	4,117	4,126	4,203	4,149	0,047
60-75	1,873	1,735	1,740	1,783	0,078

**Πίνακας Π10.4.28:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης AZD-2 από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	0,77
15-30	0,62
30-45	0,61
45-60	0,42
60-75	0,53

**Πίνακας Π10.4.29:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης AZD-2 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,9291	0,9354	0,9390	0,9345	0,0050
15-30	0,9052	0,8930	0,8979	0,8987	0,0061
30-45	0,8501	0,8472	0,8448	0,8474	0,0026
45-60	0,7231	0,7236	0,7277	0,7248	0,0025
60-75	0,469	0,442	0,443	0,451	0,015

*Π10.4.7 Όταν στο γαστρικό διαμέρισμα τοποθετήθηκε SB Εναιώρημα ή Διάλυμα*

**Πίνακας Π10.4.30:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Εναιωρήματος 1 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	6,90	6,48	6,56	6,64	0,22
15-30	4,010	3,965	4,057	4,010	0,046
30-45	1,845	1,902	1,923	1,890	0,040
45-60	0,546	0,526	0,536	0,536	0,010
60-75	0,15	-0,11	-0,19	-0,05	0,18

**Πίνακας Π10.4.31:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Εναιωρήματος 1 από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	1,35
15-30	-0,24
30-45	-0,61
45-60	-0,77
60-75	-0,87

**Πίνακας Π10.4.32:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Εναιωρήματος 1 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,7025	0,6857	0,6891	0,6925	0,0089
15-30	0,8474	0,8460	0,8488	0,8474	0,0014
30-45	0,8629	0,8655	0,8665	0,8650	0,0019
45-60	0,8524	0,8504	0,8514	0,8514	0,0010
60-75	0,887	0,854	0,841	0,861	0,024



**Πίνακας Π10.4.33:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 1 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	-0,024	0,006	-0,006	-0,008	0,015
15-30	-0,038	0,003	-0,004	-0,013	0,022
30-45	-0,012	0,020	-0,010	-0,001	0,018
45-60	-0,0147	-0,0089	-0,0240	-0,0159	0,0076
60-75	0,052	0,013	0,012	0,026	0,023

**Πίνακας Π10.4.34:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 1 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	6,613	6,535	6,599	6,583	0,041
15-30	4,1020	4,1012	4,1158	4,1063	0,0082
30-45	1,588	1,614	1,556	1,586	0,029
45-60	0,373	0,425	0,444	0,414	0,037
60-75	-0,221	-0,268	-0,278	-0,255	0,030

**Πίνακας Π10.4.35:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 1 από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	1,17
15-30	0,091
30-45	-0,52
45-60	-0,82
60-75	-0,87

**Πίνακας Π10.4.36:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 1 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,7156	0,7127	0,7151	0,7145	0,0016
15-30	0,78611	0,78608	0,78669	0,78629	0,00034
30-45	0,8142	0,8161	0,8119	0,8141	0,0021
45-60	0,8681	0,8729	0,8746	0,8719	0,0034
60-75	0,8291	0,8181	0,8156	0,8209	0,0072

**Πίνακας Π10.4.37:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Εναιωρήματος 2 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	1,80	1,93	1,66	1,80	0,13
15-30	1,36	1,02	1,20	1,20	0,17
30-45	1,328	1,347	1,250	1,308	0,051
45-60	0,861	0,802	0,801	0,821	0,034
60-75	0,36	0,19	0,12	0,22	0,12

**Πίνακας Π10.4.38:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Εναιωρήματος 2 από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	-0,67
15-30	-0,54
30-45	-0,66
45-60	-0,68
60-75	-0,84

**Πίνακας Π10.4.39:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Ενωρήματος 2 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in\ vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,8826	0,8879	0,8766	0,8823	0,0056
15-30	0,806	0,773	0,791	0,790	0,016
30-45	0,8546	0,8558	0,8496	0,8533	0,0033
45-60	0,8270	0,8214	0,8213	0,8232	0,0033
60-75	0,879	0,863	0,854	0,865	0,013

**Πίνακας Π10.4.40:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 2 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in\ vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,021	0,080	0,117	0,073	0,049
15-30	-0,029	0,008	0,000	-0,007	0,020
30-45	0,0195	0,0079	0,0155	0,0143	0,0059
45-60	0,037	0,011	0,069	0,039	0,029
60-75	0,178	0,018	0,022	0,073	0,091

**Πίνακας Π10.4.41:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 2 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	10,05	9,06	8,85	9,32	0,64
15-30	6,35	6,19	6,01	6,18	0,17
30-45	2,336	2,464	2,491	2,430	0,083
45-60	0,753	0,830	0,753	0,779	0,044
60-75	0,050	0,053	0,032	0,045	0,012

**Πίνακας Π10.4.42:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 2 από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	1,84
15-30	0,96
30-45	-0,60
45-60	-0,78
60-75	-0,81

**Πίνακας Π10.4.43:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 2 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in\ vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,743	0,718	0,712	0,724	0,017
15-30	0,7339	0,7280	0,7209	0,7276	0,0066
30-45	0,8811	0,8855	0,8864	0,8843	0,0028
45-60	0,8726	0,8780	0,8726	0,8744	0,0031
60-75	0,8197	0,8203	0,8165	0,8188	0,0020

**Πίνακας Π10.4.44:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Ενωρήματος 3 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in\ vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,820	0,731	0,694	0,749	0,065
15-30	0,558	0,552	0,623	0,578	0,039
30-45	0,390	0,469	0,390	0,416	0,045
45-60	0,058	0,098	0,068	0,075	0,021
60-75	-0,042	-0,072	-0,099	-0,071	0,028

**Πίνακας Π10.4.45:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Εναιωρήματος 3 από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in\ vitro}^{inc}$
0-15	-0,61
15-30	-0,26
30-45	-0,74
45-60	-0,79
60-75	-0,83

**Πίνακας Π10.4.46:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Εναιωρήματος 3 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in\ vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,7874	0,7764	0,7716	0,7785	0,0081
15-30	0,527	0,525	0,546	0,532	0,011
30-45	0,8138	0,8237	0,8137	0,8171	0,0058
45-60	0,8008	0,8080	0,8026	0,8038	0,0038
60-75	0,8241	0,8185	0,8131	0,8186	0,0055

**Πίνακας Π10.4.47:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 3 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	0,0791	0,0857	0,0681	0,0776	0,0089
15-30	0,030	0,056	0,038	0,041	0,013
30-45	0,0290	0,0240	0,0331	0,0287	0,0046
45-60	0,011	0,016	-0,027	0,000	0,023
60-75	0,068	0,004	-0,007	0,022	0,040

**Πίνακας Π10.4.48:** Μεμονωμένοι και μέσοι (Τυπική απόκλιση) δείκτες υπερκορεσμού στο δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 3 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>		
0-15	6,397	6,358	6,537	6,430	0,094
15-30	3,855	3,743	3,729	3,776	0,069
30-45	2,287	2,196	2,134	2,205	0,077
45-60	0,445	0,356	0,335	0,379	0,058
60-75	-0,345	-0,379	-0,373	-0,366	0,018



**Πίνακας Π10.4.49:** Δείκτες υπερκορεσμού μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 3 από το γαστρικό διαμέρισμα (n = 1).

Χρονικό διάστημα (min)	$\sigma_{in vitro}^{inc}$
0-15	0,84
15-30	-0,28
30-45	-0,34
45-60	-0,74
60-75	-0,81

**Πίνακας Π10.4.50:** Μεμονωμένα και μέσα (Τυπική απόκλιση) κλάσματα καθίζησης μετά από επώαση (48h/37°C) των διηθημάτων των δειγμάτων από το δωδεκαδακτυλικό διαμέρισμα, που συλλέχτηκαν στα διάφορα 15 min χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της κένωσης SB Διαλύματος 3 από το γαστρικό διαμέρισμα.

Χρονικό διάστημα (min)	$\pi_{in vitro}^{inc}$				
	Πείραμα			Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
	1°	2°	3°		
0-15	0,7517	0,7504	0,7563	0,7528	0,0031
15-30	0,8527	0,8492	0,8488	0,8502	0,0022
30-45	0,7984	0,7927	0,7886	0,7932	0,0049
45-60	0,8180	0,8061	0,8030	0,8090	0,0079
60-75	0,7169	0,7016	0,7045	0,7077	0,0081