

**FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL DE
LOPINAVIR Y RITONAVIR EN
PACIENTES ADULTOS INFECTADOS
POR EL VIH**

José Moltó Marhuenda

Universidad Autónoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL DE LOPINAVIR Y RITONAVIR EN PACIENTES ADULTOS INFECTADOS POR EL VIH

José Moltó Marhuenda

Memoria presentada para obtener el grado de Doctor en Medicina por
la Universidad Autónoma de Barcelona

Bellaterra Junio 2008

Directores: Dr Bonaventura Clotet Sala
 Dra Marta Valle Cano

A mi familia



El Dr. Bonaventura Clotet Sala (Unidad VIH, Servicio Medicina Interna, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol) y la Dra. Marta Valle Cano (Centre d'Investigació del Medicament, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau).

Certifican:

Que el trabajo experimental y la redacción de la memoria de la tesis doctoral titulada “**FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL DE LOPINAVIR Y RITONAVIR EN PACIENTES ADULTOS INFECTADOS POR EL VIH**” han sido realizados por José Moltó Marhuenda y consideran que es apta para el trámite de lectura y defensa pública delante de un tribunal, para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Por tal motivo queda constancia en el presente documento en Barcelona, 8 de Mayo de 2008

Dr. Bonaventura Clotet Sala

Dra. Marta Valle Cano

ABREVIATURAS

AGA	α 1-glicoproteína ácida
AUC	del inglés “area under the curve”
CI ₅₀ , CI ₉₀	concentración inhibitoria 50, 90%
CL/F	aclaramiento plasmático aparente
C _{max}	concentración máxima
C _{min}	concentración mínima
C _{valle}	concentración valle
D	dosis
ε	error residual
F	biodisponibilidad
FC	del inglés “fold change”
κ	variabilidad interocasión
k _a	constante de absorción
kcal	kilocalorías
h	horas
IIV	del inglés “interindividual variability”
IOV	del inglés “interoccasion variability”
IP	inhibidor de la proteasa
IQ	del inglés “inhibitory quotient”
ITIAN	inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de los nucleósidos
ITINAN	inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de los nucleósidos
L	litros
LPV	lopinavir
LRT	del inglés “likelihood ratio test”

λ_z	constante de velocidad de primer orden asociada con la fase terminal (log-lineal) de la curva concentración-tiempo
mg	miligramos
mL	mililitros
μg	microgramos
η	variabilidad interindividual
μM	micromolar
nM	nanomolar
NONMEM	del inglés “Nonlinear Mixed Effects Modelling”
RTV	ritonavir
Sida	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
t	tiempo
TARGA	tratamiento antirretroviral de gran actividad
TDM	del inglés “therapeutic drug monitoring”
V/F	volumen aparente de distribución
VHC	virus de la hepatitis C
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
V_z	volumen aparente de distribución basado en la fase terminal de la curva concentración-tiempo
θ	parámetro farmacocinético poblacional medio

**FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL DE LOPINAVIR Y
RITONAVIR EN PACIENTES ADULTOS INFECTADOS POR EL VIH**

INTRODUCCIÓN	1
1.- Cambios en la historia natural de la infección por el VIH	3
2.- Causas del fracaso del tratamiento antirretroviral	4
2.1.- Factores relacionados con el paciente	4
2.2.- Factores relacionados con el virus	6
2.3.- Factores relacionados con los fármacos antirretrovirales	10
3.- Monitorización terapéutica de la concentración de los antirretrovirales (<i>Therapeutic Drug Monitoring</i>, TDM)	12
3.1.- Concepto	12
3.2.- Evidencia clínica sobre el uso de TDM para guiar el tratamiento antirretroviral. Ensayos clínicos prospectivos	14
3.3.- Limitaciones actuales para el empleo de TDM en el tratamiento antirretroviral	18
4.- Farmacocinética	21
4.1.- Concepto	21
4.2.- Farmacocinética poblacional	23
4.2.1.- Métodos de análisis farmacocinéticos poblacionales	24
4.2.1.1.- Análisis naïve con datos agrupados	25
4.2.1.2.- Método en dos etapas	25

4.2.1.3.- Modelos no lineales de efectos mixtos	26
4.3.- Componentes de un modelo no lineal de efectos mixtos	28
4.3.1.- Modelo estructural	29
4.3.1.1.- Modelo farmacocinético	30
4.3.1.2.- Modelo de covariables	33
4.3.2.- Modelo estadístico	36
4.3.2.1.- Variabilidad interindividual	37
4.3.2.2.- Variabilidad intraindividual	38
4.3.2.2.1.- Variabilidad interocasión ...	39
4.3.2.3.- Variabilidad residual	40
5.- Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de lopinavir	43
5.1.- Propiedades farmacocinéticas	43
5.1.1.- Absorción	43
5.1.2.- Distribución	46
5.1.3.- Metabolismo y eliminación	47
5.1.4.- Poblaciones especiales	48
5.1.4.1.- Insuficiencia hepática	48
5.1.4.2.- Población pediátrica	49
5.1.4.3.- Gestación	49
5.1.5.- Interacciones farmacológicas	50
5.2.- Propiedades farmacodinámicas	51
5.2.1.- Actividad antirretroviral <i>in vitro</i>	51
5.2.2.- Actividad antirretroviral <i>in vivo</i>	52
5.2.2.1.- Pacientes sin experiencia antirretroviral previa (naïve)	52

5.2.2.2.- Pacientes con experiencia antirretroviral previa (tratamiento de rescate)	53
5.2.2.2.1.- Predictores de respuesta al tratamiento de rescate con lopinavir/ritonavir	54
HIPÓTESIS	59
OBJETIVOS	63
PUBLICACIONES	67
1.- Estudio 1	
Variability in Antiretroviral Agents Concentration in Plasma among HIV-Infected Adults in Routine Clinical Practice. <u>Br J Clin Pharmacol 2006;62:560-566</u>	71
2.- Estudio 2	
Lopinavir/Ritonavir Pharmacokinetics in HIV and Hepatitis C Virus Co-Infected Patients without Liver Function Impairment. Influence of Liver Fibrosis. <u>Clin Pharmacokinet 2007;46:85-92</u>	81
3.- Estudio 3	
Simultaneous Population Pharmacokinetic Model for Lopinavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults. <u>Clinical Pharmacokinetics 2008 (en prensa)</u>	91
DISCUSIÓN	129

CONCLUSIONES 147

BIBLIOGRAFÍA 151

INTRODUCCIÓN

1.- Cambios en la historia natural de la infección por el VIH

Desde la introducción de los fármacos inhibidores de la proteasa (IP) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), a mediados de los años 90, se han producido importantes cambios en la historia natural de la enfermedad causada por este virus. La disponibilidad de los IP permitió diseñar esquemas terapéuticos con una elevada potencia antirretroviral (esquemas de tratamiento antirretroviral de gran actividad, TARGA), capaces de suprimir la replicación del VIH de un modo más efectivo que las mono o biterapias con inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIAN) empleadas anteriormente. La generalización del uso del TARGA para el tratamiento de los pacientes infectados por el VIH se tradujo en un dramático descenso de la incidencia de enfermedades oportunistas y de la mortalidad asociadas a dicha infección durante la segunda mitad de los años 90.¹ Así, la tasa de nuevos casos de sida en España pasó de ser de 169 nuevos casos por millón de habitantes en el año 1996 a sólo 11 nuevos casos por millón de habitantes en el año 2005, lo que supone una reducción del 69% (Figura 1).²

Sin embargo, a pesar del empleo del TARGA, existe una proporción no despreciable de pacientes infectados por el VIH en los que no se logra suprimir la replicación viral de un modo sostenido a lo largo del tiempo.^{3, 4} Como muestran los resultados de un meta-análisis que evaluó la eficacia del tratamiento antirretroviral en más de 13.000 pacientes naïve procedentes de 49 ensayos clínicos, únicamente el 57% de los pacientes lograron mantener una carga viral menor a 50 copias/mL tras 48 semanas de seguimiento.³

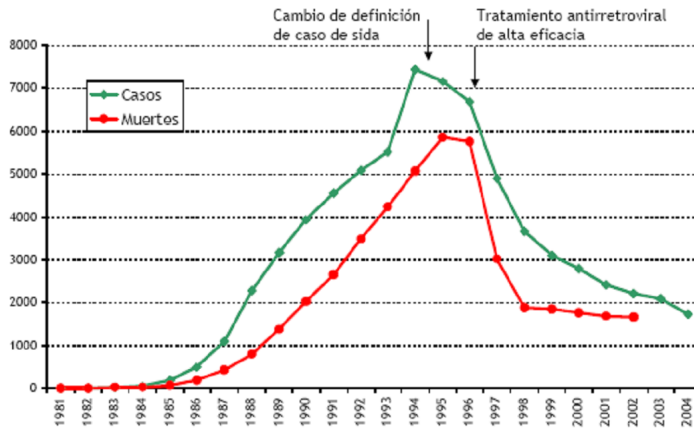


Figura 1. Incidencia de sida en España corregida por retraso en la notificación. Registro Nacional de Sida. Actualización a 30 de Junio de 2005.²

2.- Causas del fracaso del tratamiento antirretroviral

El fracaso del tratamiento antirretroviral es un fenómeno multifactorial en el que pueden coexistir múltiples causas. Entre ellas, unos factores dependen del paciente, otros del propio virus y otros están relacionados con los fármacos antirretrovirales.

2.1.- Factores relacionados con el paciente

La adherencia al tratamiento y la aparición de acontecimientos adversos son probablemente las causas del fracaso del tratamiento que tienen una mayor relevancia clínica.

La necesidad de mantener una adherencia estricta al tratamiento antirretroviral para lograr la supresión mantenida de la replicación viral es un hecho bien conocido en la actualidad. La ausencia de una adherencia adecuada al tratamiento puede llevar al fracaso virológico y al eventual desarrollo de resistencia del VIH a los fármacos

antirretrovirales, así como a la progresión de la enfermedad.⁵⁻¹² Aunque existen discrepancias entre los diferentes estudios publicados sobre cuál es el nivel de adherencia por debajo del cual aumenta el riesgo de fracaso del tratamiento, en general, se acepta que para alcanzar la supresión mantenida de la replicación viral es necesario mantener una adherencia al tratamiento de al menos el 80% de las dosis prescritas.^{5, 9} Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo por Arnsten *et al*,⁹ la probabilidad de mantener la supresión completa de la replicación viral tras 24 semanas de tratamiento era 12 veces mayor en los pacientes con una adherencia igual o mayor al 90%, comparado con los pacientes con una adherencia inferior al 90% de las dosis prescritas (Figura 2).

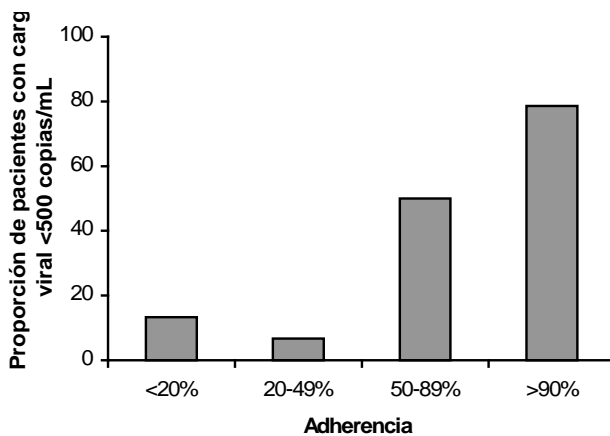


Figura 2. Proporción de pacientes con carga viral < 500 copias/mL tras 24 semanas de seguimiento, en función de la adherencia al tratamiento (evaluada mediante monitorización electrónica. Medical Events Monitoring System, MEMS).⁹

A pesar de las consecuencias negativas que supone mantener una adherencia subóptima al tratamiento antirretroviral, la adherencia media de los pacientes fuera de los ensayos clínicos suele situarse alrededor de tan sólo el 70% de las dosis prescritas, lo que indica que una proporción importante de pacientes mantiene tasas de

adherencia inferiores a las recomendadas.^{5, 9, 13-17} Además, la adherencia habitualmente disminuye con el paso del tiempo, con descensos significativos de la misma tras únicamente 3-6 meses en tratamiento.^{17, 18}

Los efectos secundarios derivados del tratamiento y la complejidad de los esquemas antirretrovirales constituyen las principales dificultades que los pacientes refieren para mantener una adherencia adecuada al tratamiento antirretroviral.^{5, 19, 20} Según datos procedentes de la Italian Cohort of Antiretroviral-Naïve Patients (cohorte I.Co.N.A.), la tercera parte de los pacientes que inician tratamiento antirretroviral por primera vez interrumpen dicho tratamiento durante el primer año de seguimiento, siendo la aparición de efectos secundarios el principal motivo responsable de tal interrupción.²¹ Por otro lado, el número de comprimidos y de dosis diarias, así como las restricciones alimentarias necesarias para la correcta administración de algunos antirretrovirales, son algunas características del tratamiento que dificultan la correcta adherencia al mismo por parte de los pacientes.^{5, 19, 22}

2.2.- Factores relacionados con el virus.

Entre los factores relacionados con el fracaso terapéutico que dependen del virus, el más importante es la resistencia del VIH a los fármacos antirretrovirales.

La aparición de resistencia del VIH a los antirretrovirales se debe a la gran capacidad de replicación del VIH-1. Cada día se producen alrededor de 10^{10} - 10^{11} nuevas partículas virales.²³ Este hecho, unido a que la transcriptasa inversa tiene una tasa de error de aproximadamente 10^{-4} , sin que los errores de lectura sean reparados,

hace posible la aparición de cualquier mutación en el genoma viral diariamente.²⁴ Sin embargo, para que se seleccionen cepas virales con resistencia a los antirretrovirales es necesario que la replicación viral tenga lugar en presencia de una presión selectiva, impuesta por la exposición a los fármacos, tal y como ocurre cuando el esquema terapéutico no es lo suficientemente potente o cuando las concentraciones de los fármacos no son lo suficientemente elevadas como para suprimir completamente la replicación viral (Figura 3).²⁵⁻³¹

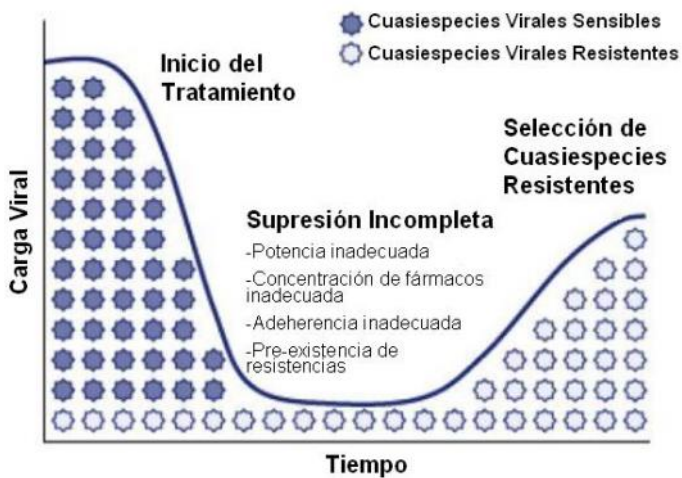


Figura 3. Proceso de selección de cepas virales con resistencia a los antirretrovirales

En general, la aparición de resistencia a los antirretrovirales es un proceso gradual, durante el cual se va seleccionando un número creciente de mutaciones en el genoma viral a lo largo del tiempo. Esta acumulación de mutaciones se traduce en un incremento paulatino de la concentración del fármaco necesaria para inhibir la replicación viral, hasta que, finalmente, el fármaco es incapaz de suprimir la replicación

del virus (resistencia de alto nivel). El número de mutaciones necesarias para producir resistencia de alto nivel a un fármaco determina la barrera genética del mismo. Así, podemos diferenciar entre fármacos con una barrera genética baja, como la lamivudina, la emtricitabina o los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINAN), en los que basta la presencia de una sola mutación en el gen de la transcriptasa inversa para que el virus sea completamente resistente al fármaco;³²⁻³⁴ y fármacos con una barrera genética alta, como los inhibidores de la proteasa potenciados con ritonavir, en los que son necesarias varias mutaciones en el gen de la proteasa para que el fármaco pierda completamente su actividad antirretroviral.³⁵

Con la excepción de la posible utilidad de mantener el tratamiento con lamivudina a pesar de la existencia de resistencia de alto nivel al fármaco (determinada por la presencia de la mutación M184V en el gen de la transcriptasa),^{36, 37} la inclusión de fármacos frente a los que el virus presenta resistencia de alto nivel no es recomendable en la práctica clínica. Esta estrategia se traduce en una disminución de la potencia antirretroviral del esquema terapéutico (mono o biterapias encubiertas), lo que favorece el fracaso del mismo y la selección de nuevas mutaciones relacionadas con resistencia, que pueden limitar la eficacia de futuros regímenes terapéuticos.³⁸⁻⁴⁶ Por otro lado, supone un gasto farmacéutico innecesario y expone inútilmente a los pacientes a la aparición de posibles efectos secundarios. Para evitarlo, durante los últimos años se han desarrollado distintas herramientas que permiten determinar la existencia de resistencia a los fármacos antirretrovirales en los pacientes infectados por el VIH en la práctica clínica y, así, optimizar los esquemas de tratamiento antirretroviral de una forma guiada.

La resistencia a los fármacos antirretrovirales puede determinarse mediante tests genotípicos o tests fenotípicos.^(47, 48) Los test genotípicos actualmente comercializados se basan en la determinación de la secuencia de nucleótidos de los genes de la transcriptasa inversa y de la proteasa viral. La secuencia obtenida se compara posteriormente con la secuencia de una cepa viral de referencia que es sensible a los antirretrovirales (virus *wild-type*), identificándose las mutaciones virales relacionadas con resistencia a cada uno de los fármacos. Estos tests tienen la ventaja de ser más rápidos y baratos que los tests fenotípicos. Sin embargo, para su correcta interpretación, es necesario conocer el impacto de cada una de las posibles mutaciones virales en la sensibilidad a los diferentes fármacos, así como del posible efecto resultante de la interacción entre las diferentes mutaciones que pueden estar presentes en un mismo individuo. Por ello, para poder interpretar correctamente los resultados del genotipo viral, habitualmente se recurre al uso de diferentes algoritmos o bien al consejo de grupos de expertos.⁴⁹⁻⁵⁴ Los tests de resistencia fenotípicos miden directamente la actividad replicativa del virus en presencia de concentraciones crecientes de los distintos fármacos. Estos tests aportan una información más directa que los tests genotípicos sobre la sensibilidad viral (generalmente expresada como la concentración del fármaco necesaria para inhibir el 50% o el 90% de la replicación viral [CI_{50} , CI_{90}], o como la razón entre la CI_{50} o CI_{90} de la cepa problema y la CI_{50} o CI_{90} del virus *wild-type* [*fold change*, FC]). Aunque su interpretación resulta más sencilla que la del genotipo, los tests fenotípicos precisan de una técnica muy laboriosa, lo que incrementa su coste y supone una demora en la obtención de los resultados. Con el fin de superar estas limitaciones, hace unos años se desarrolló un nuevo método para interpretar los resultados genotípicos: el fenotipo virtual. Este método utiliza bases de datos que contienen

información de miles de cepas virales de las que se conoce tanto su genotipo como su fenotipo real. El fenotipo virtual consiste en una estimación probabilística del fenotipo real, basada en los genotipos que son similares al del paciente en determinados codones del genoma viral. Se ha demostrado una elevada correlación entre el fenotipo virtual y el fenotipo real, con una tasa de concordancia del 90% y con discordancias importantes sólo en el 3% de los casos.⁵⁵

Diferentes ensayos clínicos han puesto de manifiesto la utilidad clínica del empleo de los tests de resistencia para guiar la elección de los fármacos antirretrovirales de forma individualizada.⁵⁶⁻⁶³ Por ello, la realización de estos estudios se incluye dentro de las recomendaciones para el manejo del tratamiento antirretroviral en los pacientes infectados por el VIH emitidas por las principales sociedades científicas nacionales e internacionales.^{47, 64, 65}

2.3.- Factores relacionados con los fármacos antirretrovirales

Además de los factores que dependen del paciente y de virus, la potencia antirretroviral intrínseca de los fármacos incluidos en el esquema de tratamiento y sus características farmacocinéticas son aspectos de gran relevancia para obtener la respuesta terapéutica deseada.

Durante los últimos años se han publicado los resultados de un número creciente de estudios relacionando la respuesta al tratamiento con la exposición a los fármacos antirretrovirales, principalmente a los IP e ITINAN.⁶⁶⁻⁸² Según los resultados de estos estudios, la concentración plasmática de los antirretrovirales puede explicar, al menos en parte, tanto el fracaso del tratamiento como la

aparición de acontecimientos adversos. Así, pequeños descensos en la concentración de los antirretrovirales pueden hacer que dicha concentración sea insuficiente para inhibir la replicación viral, permitiendo que ésta tenga lugar bajo una presión selectiva y favoreciendo, por tanto, la selección de cepas virales resistentes a los fármacos y el fracaso del tratamiento.^{67, 68, 71-73, 79, 80, 82} Por el contrario, concentraciones de fármaco excesivamente elevadas pueden contribuir a la aparición algunos acontecimientos adversos como es el caso de nefrolitiasis por indinavir,⁷⁰ de efectos secundarios a nivel del sistema nervioso central por efavirenz,⁷⁷ de hiperbilirrubinemia por atazanavir⁸² y, posiblemente, de intolerancia digestiva e hiperlipemia por el resto de los IP.

Aunque la administración de los antirretrovirales se realiza convencionalmente según esquemas de dosificación fijos, la concentración plasmática observada tras la administración de una misma dosis de estos fármacos puede variar de forma muy notable entre diferentes sujetos (variabilidad interindividual).^{66, 74, 77, 83-89} A modo de ejemplo, en el estudio POPIN,⁸⁸ en el que se determinó la concentración valle (C_{valle}) de diferentes IP e ITINAN en 427 muestras procedentes de 108 pacientes, la variabilidad interindividual observada (coeficiente de variación, %) fue la siguiente: efavirenz 77,5%, nevirapina 74,5%, lopinavir 73,4%, nelfinavir 83,7%, indinavir 80,8%, saquinavir 113,4%. Además, el 38% de los pacientes mostraron una C_{valle} inferior a la concentración mínima efectiva propuesta para cada uno de los fármacos en ese estudio.

Los motivos que explican esta variabilidad en las concentraciones plasmáticas de los antirretrovirales son muy diversos e incluyen diferencias en la adherencia al tratamiento, la presencia de enfermedades concomitantes como la co-infección por virus

hepatotropos entre otras, o las posibles interacciones de los antirretrovirales con la comida, con otros fármacos o entre ellos mismos.⁹⁰⁻⁹³ Además, diferencias fisiológicas en la absorción, distribución y eliminación de los fármacos entre diferentes individuos pueden aumentar aún más dicha variabilidad. Como resultado, una proporción no despreciable de los pacientes puede presentar concentraciones plasmáticas de los antirretrovirales inferiores a la concentración mínima efectiva recomendada y, en consecuencia, podrían presentar un mayor riesgo de fracaso virológico a pesar del tratamiento antirretroviral.^{67, 73, 79, 86, 88-90, 94}

3.- Monitorización terapéutica de la concentración de los antirretrovirales (*Therapeutic Drug Monitoring*, TDM)

3.1.- Concepto

Como se ha comentado previamente, la administración de los fármacos antirretrovirales se ha venido realizando convencionalmente según esquemas de dosificación fijos, o en función del peso del individuo en el caso de determinados fármacos. Por el contrario, la monitorización terapéutica de la concentración de los antirretrovirales, también conocida como *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM), propone una dosificación individualizada de los antirretrovirales, de forma guiada por la concentración plasmática del fármaco observada en cada paciente, con el objetivo de mantener dicha concentración dentro de un rango preestablecido (intervalo terapéutico).⁶⁶

Esta estrategia la introdujo Otto Ruth hace 70 años,⁹⁵ quien recomendaba monitorizar las concentraciones del antagonista de los canales del calcio bepridilo para mejorar la eficacia terapéutica y reducir el riesgo de aparición de acontecimientos adversos en los

pacientes tratados con este fármaco. Desde entonces, su uso se ha extendido al tratamiento con otros fármacos, y la monitorización terapéutica se aplica actualmente de forma rutinaria para optimizar diversos tratamientos en la práctica clínica (antibioterapia con aminoglucósidos en la endocarditis infecciosa, tratamiento anticomial, tratamiento antiarrítmico con digoxina, etc.). Sin embargo, el empleo de TDM en el campo de la terapia antirretroviral es mucho más reciente y, por tanto, contamos con una experiencia aún limitada en muchos aspectos.

Los fármacos IP e ITINAN poseen una serie de características que los hacen ser buenos candidatos para el uso de TDM en la práctica clínica: i) en general, existe una relación entre la exposición al fármaco y la eficacia y la toxicidad del mismo;^{66, 77, 78, 96} ii) las concentraciones plasmáticas del fármaco tras la administración de una misma dosis a diferentes individuos muestran una variabilidad interindividual considerable,^{66, 77, 97} lo que hace que sea difícil predecir la concentración del fármaco en un paciente en particular; iii) aunque las concentraciones plasmáticas observadas tras la administración de dosis repetidas del fármaco varían dentro de un mismo individuo, la variabilidad intraindividual es menor que la variabilidad interindividual;^{83, 88, 89, 98-101} y, iv) las concentraciones plasmáticas de los IP e ITINAN se pueden determinar de un modo fiable mediante técnicas relativamente sencillas.¹⁰²⁻¹⁰⁴ En el caso de los ITIAN, el uso de TDM en la práctica clínica se ve limitado por la necesidad de estos fármacos de sufrir varias fosforilaciones intracelulares para convertirse en su forma activa y de no existir una relación directa entre su concentración plasmática e intracelular.⁶⁶ Por ello, para realizar TDM en el caso de los ITIAN sería necesario determinar la concentración intracelular de los fármacos activos, lo que resulta muy costoso técnicamente.

3.2.- Evidencia clínica sobre el uso de TDM para guiar el tratamiento antirretroviral. Ensayos clínicos prospectivos.

La utilidad de TDM en el campo del tratamiento antirretroviral ha sido evaluada de forma prospectiva en diferentes ensayos clínicos realizados en pacientes con y sin experiencia antirretroviral previa. Según los resultados de estos estudios, aunque el uso de TDM para guiar la dosificación de algunos antirretrovirales puede ser beneficioso en pacientes sin experiencia antirretroviral previa (naïve),^{94, 105} la utilidad clínica de esta estrategia en pacientes con experiencia antirretroviral (tratamiento de rescate) sigue siendo controvertida en la actualidad.^{89, 106-109}

La evidencia sobre los beneficios derivados del uso de TDM en pacientes infectados por el VIH naïve al tratamiento antirretroviral se limita al tratamiento con esquemas que contienen los IP indinavir o nelfinavir, ambos no potenciados con ritonavir. La dosificación de estos fármacos basada en su concentración plasmática se tradujo en una reducción cercana al 50% de la proporción de pacientes con fracaso terapéutico tras 48 semanas de seguimiento, comparado con el empleo de dosis fijas. Estas diferencias se atribuyeron a una menor incidencia de acontecimientos adversos en los pacientes tratados con indinavir y a una menor tasa de fracaso virológico en los pacientes tratados con nelfinavir.^{94, 105}

La utilidad del uso de TDM en el tratamiento de rescate de los pacientes con experiencia antirretroviral previa fue inicialmente evaluada en los estudios PharmAdapt y GENOPHAR, ambos de diseño similar.^{106, 107} Los participantes en estos estudios eran pacientes infectados por el VIH en situación de fracaso virológico a

pesar de estar recibiendo TARGA. Tras su inclusión, la nueva pauta de tratamiento se diseñó de forma individualizada, mediante el empleo de tests de resistencia genotípicos, y los pacientes fueron aleatorizados a recibir dosis fijas de los fármacos (grupo control) o bien de forma guiada mediante TDM (grupo TDM). En ambos estudios, la C_{valle} de los IP se determinó 4 semanas después del inicio del nuevo tratamiento, y, basándose en dicha C_{valle} y en la concentración objetivo a alcanzar, la modificación de las dosis de los fármacos se realizó, en los pacientes aleatorizados al grupo TDM, a las 8 semanas de haber iniciado el nuevo esquema de tratamiento. Ninguno de los dos estudios demostró la existencia de diferencias significativas entre el grupo control y el grupo TDM en lo que se refiere al descenso de la carga viral plasmática o a la proporción de pacientes con carga viral indetectable tras 12 semanas de tratamiento.

Sin embargo, los estudios PharmAdapt y GENOPHAR comparten algunas limitaciones que es necesario tener en cuenta a la hora de interpretar sus resultados. Ambos estudios se realizaron en Francia, donde las guías de tratamiento antirretroviral recomiendan el uso de TDM de forma rutinaria. Por tanto, sólo se pudo evaluar la utilidad de esta estrategia a corto plazo (tras 12 semanas de seguimiento las dosis podían ser individualizadas en todos los pacientes). Por otra parte, considerando que se trataba de pacientes con fracaso previo a esquemas de tratamiento antirretroviral y que, por lo tanto, podían mostrar una sensibilidad viral disminuida a los fármacos, los valores de las concentraciones objetivo pudieron resultar inadecuadamente bajos, particularmente en el estudio PharmAdapt, en el que la concentración objetivo se definió como la CI_{50} de las cepas virales *wild-type* para cada uno de los fármacos ajustada por su unión a las proteínas plasmáticas. Otra limitación común a ambos estudios reside

en que, en los casos en los que se modificaron las dosis de los fármacos, dicha modificación no se realizó hasta que los pacientes llevaban 8 semanas recibiendo el nuevo esquema de tratamiento. Esta demora en el ajuste de las dosis hizo posible la selección de nuevas mutaciones en el genoma viral que disminuyeran aún más la sensibilidad del virus a los antirretrovirales, limitando así la probabilidad de lograr una respuesta virológica satisfactoria. Finalmente, la proporción de casos en los que el clínico siguió la recomendación de modificar las dosis de los IP fue muy baja (en torno al 30%), sobre todo en el estudio GENOPHAR, lo que restó potencia estadística a los estudios.

El estudio RADAR intentó superar las limitaciones de los estudios PharmAdapt y GENOPHAR.⁸⁹ En este estudio, 230 pacientes en fracaso virológico a pesar de estar recibiendo tratamiento antirretroviral se dividieron en cuatro grupos. En una primera aleatorización, la elección de los fármacos incluidos en el esquema de tratamiento de rescate se realizó en función de los resultados del genotipo o del fenotipo virtual. Además, dentro de cada uno de estos dos brazos del estudio, los pacientes fueron nuevamente aleatorizados a recibir dosis fijas de los IP o bien dosis guiadas mediante TDM (grupos genotipo/control, genotipo/TDM, fenotipo virtual/control, fenotipo virtual/TDM). La individualización de las dosis de los IP en los grupos TDM se podía realizar precozmente (a partir de la primera semana de tratamiento), en función de unos valores mínimos de C_{valle} que fueron previamente definidos mediante una revisión de la literatura. Sin embargo, del mismo modo a lo ocurrido en los estudios ParmAdapt y GENOPHAR, las dosis de los antirretrovirales únicamente se modificaron en la cuarta parte de los pacientes que presentaban concentraciones de IP inferiores a la concentración objetivo. Como resultado, aunque se observó una

relación entre la respuesta virológica de los pacientes y la concentración plasmática de los IP, no se encontraron diferencias significativas en la evolución de la carga viral entre los cuatro grupos del estudio.

Finalmente, durante el último año se han comunicado los resultados de dos nuevos ensayos clínicos aleatorizados evaluando la utilidad clínica del uso de TDM en el tratamiento de rescate de los pacientes infectados por el VIH. En el primer estudio se incluyeron pacientes tanto con (70%) como sin (30%) experiencia antirretroviral previa, que fueron aleatorizados a recibir tratamiento antirretroviral con dosis fijas de los fármacos o bien de forma guiada mediante TDM.¹⁰⁸ Aunque en este estudio los investigadores siguieron el consejo del farmacólogo en el 76% de las ocasiones en las que se recomendaba un cambio de la dosis del fármaco, la proporción de pacientes con carga viral indetectable tras 48 semanas de seguimiento fue similar en el grupo TDM y en el grupo control. No obstante, el descenso de la carga viral plasmática fue mayor en los pacientes en los que la concentración de los fármacos se mantuvo por encima de la concentración objetivo durante todo el periodo de seguimiento, comparado con los pacientes con concentraciones de fármaco persistentemente inferiores a la concentración objetivo, lo que nuevamente refuerza la relación entre la exposición a los antirretrovirales y su efecto terapéutico. En el segundo estudio, presentado recientemente por Demeter *et al*¹⁰⁹ 183 pacientes en situación de fracaso virológico a pesar de estar recibiendo TARGA fueron aleatorizados a recibir un esquema de tratamiento de rescate con dosis fijas de IP o bien guiadas mediante TDM. En este estudio, la concentración objetivo de cada uno de los IP se definió a nivel individual, considerando el grado de resistencia viral a los fármacos en cada uno de los pacientes en el momento de iniciar el nuevo esquema de tratamiento (cociente inhibitorio, ver apartado

3.3). Aunque la concentración media y el cociente inhibitorio de los IP aumentaron de forma significativa en el grupo de pacientes en el grupo TDM respecto a los pacientes en el grupo control, no se observaron diferencias en la evolución de la carga viral entre ambos grupos del estudio durante el seguimiento. No obstante, es importante destacar que los pacientes incluidos en este estudio presentaban un alto grado de resistencia viral a los IP empleados en el tratamiento de rescate, lo que pudo haber influido negativamente en los resultados del estudio, impidiendo observar diferencias en la respuesta virológica entre ambos grupos. Así, cuando se realizó un subanálisis incluyendo a los pacientes que tenían al menos 0,7 IP activos en el esquema de rescate, el uso de TDM sí que se tradujo en un aumento significativo de la respuesta virológica comparado con el grupo control.

3.3.- Limitaciones actuales para el empleo de TDM en el tratamiento antirretroviral

Las principales limitaciones para el uso de TDM en el tratamiento antirretroviral de los pacientes infectados por el VIH vienen determinadas por la variabilidad de las concentraciones plasmáticas de los IP e ITINAN en un mismo individuo tras la administración de dosis repetidas (variabilidad intraindividual), por la ausencia de una concentración objetivo definida para cada uno de los fármacos que sea universal para todos los pacientes (naïve y con experiencia antirretroviral previa), y por la falta de métodos adecuados para la modificación de las dosis de los antirretrovirales.

Cambios en la adherencia al tratamiento, la presencia de otras enfermedades concomitantes o las interacciones entre los antirretrovirales y otros fármacos o con los alimentos pueden hacer variar notablemente la concentración de los antirretrovirales en un

mismo individuo a lo largo del tiempo.⁹⁰⁻⁹³ Varios estudios han evaluado la magnitud de la variabilidad intraindividual de la C_{valle} de diferentes IP e ITINAN.^{88, 89, 100, 101} En general, aunque dicha variabilidad no es despreciable, lo que hace que una determinación aislada pueda no considerarse representativa de la concentración media del fármaco en un individuo en particular, su magnitud es considerablemente inferior a la de la variabilidad interindividual.

Otra limitación para el uso de TDM en el manejo del tratamiento antirretroviral viene condicionada por la ausencia de una concentración objetivo de cada uno de los diferentes IP e ITINAN aplicable a la totalidad de los pacientes, independientemente de su historia antirretroviral previa. El nivel de resistencia viral a un fármaco (CI_{50} , CI_{90}) puede variar de forma considerable entre diferentes individuos en función del número de mutaciones acumuladas en el genoma del VIH, lo que hace que una misma concentración de un fármaco pueda inhibir la replicación de una cepa viral procedente de un paciente pero no la de otro, incluso aunque la exposición previa a los antirretrovirales sea similar entre ambos individuos. Por este motivo, para evaluar la utilidad del uso de TDM en el tratamiento antirretroviral en pacientes con experiencia antirretroviral previa es necesario considerar la variabilidad existente en la CI_{50} entre diferentes individuos, lo que se puede lograr mediante el empleo del cociente inhibitorio.

El concepto del cociente inhibitorio (*inhibitory quotient*, IQ) fue introducido en el campo del tratamiento antimicrobiano en 1981 por Ellner y Neu.¹¹⁰ El IQ se define como la razón entre la concentración plasmática del fármaco y una medida de la sensibilidad de un microorganismo al mismo. Su introducción en el área del tratamiento antirretroviral tuvo lugar en el año 2000,^{111, 112} sugiriendo la posibilidad

de que ciertos fármacos (principalmente los IP) pudieran mantener parte de su actividad antirretroviral en presencia de una sensibilidad viral disminuida, mediante el incremento de sus concentraciones plasmáticas. Desde su introducción, se han propuesto diferentes métodos para el cálculo del IQ, que se diferencian en función del método empleado para determinar la sensibilidad del virus frente al fármaco en particular (Tabla 1).^{113, 114} A pesar de las limitaciones inherentes a cada tipo de IQ, este índice ha demostrado ser mejor predictor de la respuesta virológica que las resistencias virales o que la concentración valle de los IP e ITINAN considerados separadamente.^{82, 115-130}

Tabla 1. Métodos empleados para el cálculo del cociente inhibitorio

Cociente inhibitorio	Ecuación	Variante
Fenotípico	$\frac{C_{valle}}{CI_{50}}$	$\frac{C_{valle}}{CI_{90}}$ o $\frac{C_{valle}}{FC}$
Genotípico	$\frac{C_{valle}}{n^{\circ} \text{ mutaciones}}$	
Virtual	$\frac{C_{valle}}{CIV_{50}}$	$\frac{C_{valle}}{FCV}$
Normalizado	$\frac{\left(\frac{C_{valle}}{FC}\right)_{paciente}}{\left(\frac{C_{valle}}{FC}\right)_{referencia}}$	$\frac{\left(\frac{C_{valle}}{FCV}\right)_{paciente}}{\left(\frac{C_{valle}}{FCV}\right)_{referencia}}$

C_{valle} : concentración valle; CI_{50} , CI_{90} : concentración necesaria para inhibir el 50 y el 90% de la replicación viral; FC: *fold change* (número de veces que la CI_{50} de la cepa problema supera a la CI_{50} de las cepas virales *wild-type*); CIV_{50} : CI_{50} determinada mediante fenotipo virtual; FCV: *fold change* determinado mediante fenotipo virtual.

Por último, el mejor método para individualizar las dosis de los antirretrovirales sigue sin estar actualmente bien definido. La modificación de las dosis de los IP e ITINAN se ha venido realizando de un modo empírico, sin tener en cuenta la variabilidad de los parámetros que rigen la cinética de cada fármaco en la población ni las características individuales que influyen en dicha variabilidad.^{89, 94}

Además, en los estudios publicados, las dosis de los fármacos no se modificaron hasta que los pacientes alcanzaban el estado de equilibrio estacionario,^{89, 94, 105-109} lo que puede suponer una exposición subóptima a los antirretrovirales durante el inicio del tratamiento y un mayor riesgo de aparición de nuevas mutaciones virales que disminuyan la sensibilidad de la cepa viral al fármaco y que comprometan la eficacia del tratamiento a largo plazo. Por ello, sería interesante poder disponer de herramientas capaces de predecir de una forma fiable la evolución temporal de las concentraciones de un fármaco en un individuo concreto tras la administración de diferentes dosis. De este modo sería posible seleccionar aquella dosis del fármaco con una mayor probabilidad de mantener la concentración plasmática del mismo por encima de una concentración objetivo, incluso antes del inicio del nuevo esquema terapéutico. En este sentido, el desarrollo de modelos farmacocinéticos poblacionales de los fármacos antirretrovirales resulta de gran interés.

4.- Farmacocinética

4.1.- Concepto

La farmacocinética es la rama de la farmacología que se ocupa del estudio de los procesos que determinan la concentración de un fármaco en el organismo. La farmacocinética tiene una vertiente

descriptiva, representada por el estudio de los procesos de absorción, distribución, metabolismo o eliminación del fármaco; y una vertiente cuantitativa, caracterizada por el estudio matemático de los procesos que permite cuantificar y definir las velocidades de absorción (constante de absorción), su cantidad (biodisponibilidad), la eliminación (constante de eliminación, vida media, aclaramiento), el volumen en que se distribuye el fármaco (volumen de distribución) o la cantidad total de fármaco presente en el organismo (área bajo la curva).

La cinética de un fármaco puede describirse mediante dos tipos diferentes de análisis de datos: análisis modelo-independiente o análisis modelo-dependiente. El objetivo del análisis modelo-independiente, también conocido como análisis no compartimental se centra en describir el comportamiento del fármaco en el organismo más que las características estructurales o mecánicas del sistema. Este tipo de análisis está basado en la constante de eliminación (λ_z), el área bajo la curva (AUC) y la dosis administrada (D). De aquí se derivan los parámetros primarios: aclaramiento (CL) y volumen aparente de distribución (V_z). La base teórica del análisis modelo-independiente reside en tres premisas: *i*) el aclaramiento del fármaco permanece constante a lo largo del tiempo, siendo proporcional a la concentración del fármaco; *ii*) el fármaco presenta una cinética lineal que no varía a lo largo del tiempo; y, *iii*) la fase terminal en la relación concentración-tiempo es de carácter monoexponencial.^{131, 132} Como es fácil suponer, a menudo los sistemas farmacocinéticos no reúnen estas tres condiciones, por lo que el análisis no compartimental resulta de validez sólo en un sentido aproximado. Esto hace que, cuando el objetivo del análisis es el de describir las características de un sistema, el análisis de datos modelo-dependiente sea generalmente preferido al análisis no compartimental.¹³³ El análisis

compartimental o modelo-dependiente permite caracterizar el comportamiento cinético del fármaco mediante ecuaciones que describen la evolución de las concentraciones de fármaco en el organismo en función del tiempo. La solución de estas ecuaciones farmacocinéticas, dependientes del modelo, permite obtener los valores de los parámetros cinéticos en el individuo.

4.2.- Farmacocinética poblacional

La farmacocinética poblacional trata de integrar información sobre los parámetros farmacocinéticos típicos que rigen los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco en una población, y la información acerca de su variabilidad inter e intraindividual.¹³⁴

El propósito de la farmacocinética poblacional es proporcionar unas guías para la individualización de la dosis del fármaco y así maximizar la probabilidad de obtener una respuesta satisfactoria tras la administración del mismo. Cuando se dispone de varias medidas de la concentración del fármaco tras su administración, generalmente en un número limitado, el uso de modelos farmacocinéticos poblacionales permite estimar los parámetros farmacocinéticos individuales, que hacen posible individualizar la dosis en cada caso en particular. Incluso en situaciones en las que no se dispone de medidas de la concentración del fármaco tras su administración, se puede seleccionar la dosis del fármaco a administrar teniendo en cuenta determinadas características demográficas y clínicas del paciente.

Los objetivos específicos de la farmacocinética poblacional pueden resumirse en los siguientes: ñ) determinar los parámetros

farmacocinéticos medios (típicos) de la población; *ii*) identificar y determinar la variabilidad interindividual e intraindividual en el comportamiento cinético del fármaco; *iii*) explicar la variabilidad observada mediante determinados factores (demográficos, clínicos, genéticos, ambientales, etc.) que pueden influenciar el comportamiento cinético del fármaco; y, *iv*) cuantificar la magnitud de la variabilidad residual no explicada.¹³⁵⁻¹³⁷

El perfil cinético de un fármaco en una población viene determinado por tres tipos de parámetros:^{138, 139}

1. Parámetros de efectos fijos: cuantifican el comportamiento cinético del fármaco en la población mediante la caracterización de parámetros poblacionales medios y de sus posibles relaciones con ciertos factores individuales.
2. Parámetros de efectos aleatorios interindividuales: cuantifican la magnitud de la variabilidad cinética entre diferentes individuos de la población. Es decir, describen la dispersión de los parámetros farmacocinéticos con relación a sus valores medios y determinan, mediante varianzas, la magnitud de la misma.
3. Parámetros de efectos aleatorios intraindividuales: cuantifican la variabilidad en los parámetros cinéticos dentro de un mismo individuo. Incluyen la variabilidad entre diferentes ocasiones, la variabilidad intraindividual, el error analítico, posibles errores en el desarrollo del experimento o en la especificación del modelo, etc.

4.2.1.- Métodos de análisis farmacocinéticos poblacionales

Existen diferentes aproximaciones para tratar de caracterizar el comportamiento cinético de un fármaco en una población. Aunque el

objetivo de esta tesis no es el de realizar una revisión exhaustiva de las mismas, seguidamente se resumen algunas de ellas:

4.2.1.1.- Análisis naïve con datos agrupados

Si el objetivo del análisis se centra en determinar los parámetros poblacionales, el método más sencillo para lograrlo es considerar todos los datos como si provinieran de un único individuo.¹⁴⁰⁻¹⁴²

Entre las ventajas de este método destacan su simplicidad y el hecho de que permite estimar los parámetros poblacionales medios cuando el número de observaciones en cada individuo es limitado, sin importar el número de observaciones en cada individuo, así como cuando las observaciones se han realizado en tiempos diferentes en cada sujeto. Sin embargo, el análisis naïve no permite determinar las fuentes de variabilidad en la cinética del fármaco, no distingue entre variabilidad inter o intraindividual, y la fiabilidad de los estimados de los parámetros depende del número de observaciones realizadas en cada individuo.^{140, 142-145}

4.2.1.2.- Método en dos etapas

En la primera etapa de este método de análisis se estiman los parámetros farmacocinéticos de cada individuo en particular de un modo independiente, y los parámetros farmacocinéticos poblacionales se obtienen calculando la media, la varianza y la covarianza de cada uno de los parámetros.^{140, 142, 146} La relación entre los parámetros de efectos fijos y las covariables de interés se puede investigar mediante métodos gráficos o mediante técnicas de regresión.

El método en dos etapas tiene las ventajas de ser sencillo, de reducir la posibilidad de sesgos respecto al análisis naïve (los parámetros farmacocinéticos se estiman para cada individuo), y de permitir estudiar la influencia de covariables en la variabilidad interindividual de los parámetros. Sin embargo, este método no permite diferenciar entre la variabilidad inter e intraindividual de los parámetros. Por otra parte, la fiabilidad de los estimados individuales obtenidos mediante este método está relacionada con el número de observaciones disponibles en cada voluntario, lo que puede conducir a sobreestimar la variabilidad interindividual en los parámetros cinéticos cuando el número de observaciones es limitado.^{143, 144, 147} En consecuencia, para poder estimar los parámetros farmacocinéticos individuales de modo fiable, es necesario poder disponer de un elevado número de observaciones en cada sujeto, lo que muchas veces no es posible en la práctica clínica por motivos éticos y logísticos. Por ello, el análisis poblacional mediante el método en dos etapas suele realizarse con datos procedentes de poblaciones de voluntarios sanos, con unas características bastante homogéneas y siguiendo protocolos bastante rígidos en cuanto al número de muestras y los tiempos de muestreo, lo que puede dificultar la extrapolación de los resultados obtenidos a las poblaciones de pacientes a las que finalmente va a ir destinado el fármaco.

4.2.1.3.- Modelos no lineales de efectos mixtos

Este tipo de análisis se basa en el principio de que los parámetros farmacocinéticos de un individuo en particular surgen de una distribución de dichos parámetros en la población, la cual se puede describir mediante una media poblacional y una variabilidad interindividual.^{140, 142, 148-151} Así, a diferencia del método en dos etapas,

la unidad de análisis de los modelos no lineales de efectos mixtos es la población y no el individuo.

Mediante este método, todos los individuos se analizan simultáneamente, estimándose los parámetros poblacionales medios, la relación entre los parámetros cinéticos y las covariables, la variabilidad interindividual y el error residual en una única etapa. Los parámetros cinéticos individuales pueden calcularse mediante estimaciones bayesianas. Además, ya que consideran a cada sujeto individualmente, permiten combinar datos procedentes de pacientes con un elevado número de observaciones (*rich data*) con otros de pacientes en los que el número de observaciones es menor (*sparse data*), sin que ello suponga un sesgo en los estimados finales.^{144, 145} No obstante, este tipo de análisis de datos es mucho más complejo estadísticamente y el tiempo de cálculo puede ser considerablemente más largo que el empleado en los métodos naïve o en dos etapas.

El desarrollo de modelos no lineales de efectos mixtos puede realizarse mediante el uso de diferentes programas informáticos, de entre los cuales NONMEM (Nonlinear Mixed Effects Modelling) es el más ampliamente utilizado.^{136, 141, 143, 144, 152-156} NONMEM es un programa informático que estima los parámetros de los modelos no lineales de efectos mixtos de forma paramétrica, de acuerdo a la función de máxima verosimilitud. El programa realiza una búsqueda iterativa a lo largo del rango de los parámetros especificados en el modelo, terminando al lograr maximizar la función de máxima verosimilitud. El valor de la función objetiva, calculado por NONMEM, es una aproximación a la función de verosimilitud. Asumiendo que los parámetros de efectos aleatorios tienen una distribución normal, la función objetiva es igual a menos dos veces el logaritmo de la verosimilitud.

4.3.- Componentes de un modelo no lineal de efectos mixtos

Los modelos farmacocinéticos de efectos mixtos consideran conjuntamente la influencia de los parámetros de efectos fijos y aleatorios sobre las concentraciones observadas del fármaco, permitiendo la estimación simultánea de todos los parámetros que cuantifican esta influencia. Dentro de un modelo no lineal de efectos mixtos podemos distinguir dos partes (Figura 4): un modelo estructural y un modelo estadístico.¹⁵¹ El modelo estructural está compuesto, a su vez, por un modelo farmacocinético, que describe la evolución media de las concentraciones predichas en función de los parámetros cinéticos poblacionales, y un modelo de regresión o de covariables, que relaciona los parámetros cinéticos con las características de los pacientes. El modelo estadístico tiene el objeto de evaluar la magnitud de la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos y de la variabilidad residual.

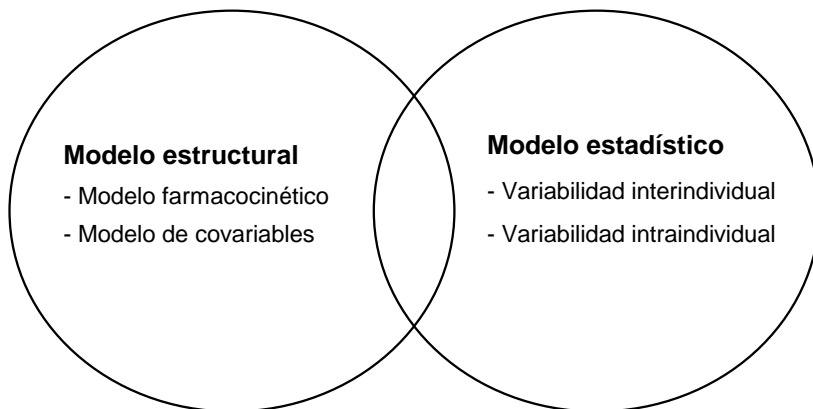


Figura 4. Componentes de un modelo farmacocinético de efectos mixtos.

En general, el desarrollo de un modelo poblacional consta de varias etapas. Inicialmente se desarrolla un modelo farmacocinético, al que

posteriormente se añade un modelo estadístico. El modelo resultante de esta etapa es habitualmente conocido como modelo básico. En un segundo tiempo, se evalúa la posible influencia de las covariables en los parámetros del modelo básico, y las covariables relacionadas con los parámetros se introducen en el modelo de modo secuencial (ver apartado 4.3.1.2). Tras la introducción de las covariables, el modelo estadístico se revisa nuevamente. El resultado de todo el proceso es el modelo final.¹⁵¹

4.3.1.- Modelo estructural

El componente estructural de un modelo de efectos mixtos define el comportamiento cinético del fármaco en el individuo típico (medio) de la población en función de ciertos factores (covariables) capaces de alterarlo.¹⁵¹ Como se ha mencionado, el modelo estructural está formado por un modelo farmacocinético y un modelo de covariables (Figura 5).

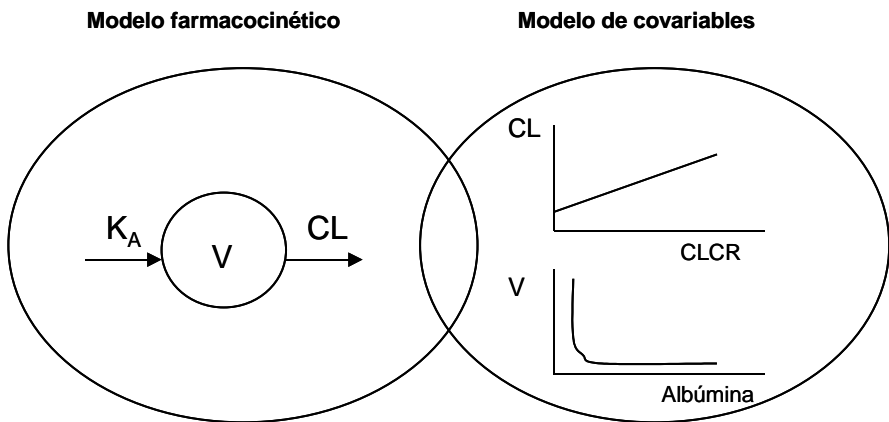


Figura 5. Componentes del modelo estructural.

K_A : constante de absorción de primer orden; V: volumen aparente de distribución; CL: aclaramiento plasmático aparente; CLCR: aclaramiento de creatinina

4.3.1.1.- Modelo farmacocinético

Un modelo farmacocinético es una expresión matemática que, en términos generales, permite relacionar la dosis de un fármaco con el curso temporal de sus concentraciones en el organismo tras la administración del mismo, de modo que la diferencia entre las concentraciones predichas por el modelo y las concentraciones realmente observadas en el individuo sea lo menor posible.¹⁵¹

En general, los modelos farmacocinéticos pueden dividirse en modelos mecanísticos y modelos empíricos. Los modelos mecanísticos, también llamados modelos fisiológicos, asumen que el sistema está formado por diferentes tejidos en los que el fármaco se distribuye con diferentes constantes de velocidad (Figura 6).¹⁵¹ Sin embargo, los sistemas biológicos son inherentemente no lineales, potencialmente infinitos en dimensiones y con una complejidad tal que dificulta enormemente estimar todos sus parámetros cinéticos y poder describir el modelo verdadero que rige el comportamiento del sistema. Además, la imposibilidad de obtener muestras de los diferentes tejidos no permite el uso de modelos fisiológicos en humanos. Por ello, una solución a esta limitación consiste en el desarrollo de modelos farmacocinéticos empíricos o compartimentales.^{133, 151} En estos modelos, los componentes del sistema que son cinéticamente homogéneos se agrupan en un número discreto de compartimentos, con entradas y pérdidas del fármaco especificadas. Dos componentes de un sistema se consideran homogéneos cinéticamente cuando el fármaco que entra en los mismos se distribuye por igual y cada partícula de fármaco en el compartimento tiene la misma probabilidad de ser eliminada del mismo. El desarrollo de modelos compartimentales tiene la ventaja de

permitir llevar a cabo una descripción del sistema farmacocinético de un modo más mecanístico que en el caso del análisis no compartimental, aunque sin llegar a la complejidad inherente a los modelos fisiológicos.

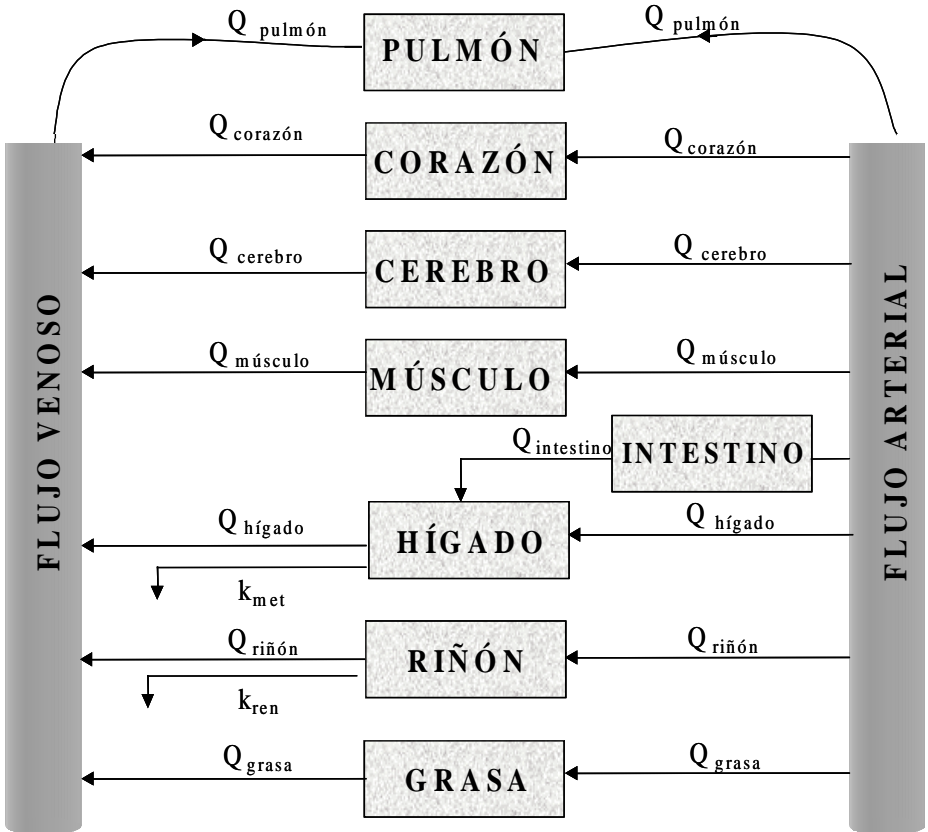


Figura 6. Representación esquemática de un modelo farmacocinético fisiológico. Cada recuadro representa un compartimento tisular. Q representa el flujo sanguíneo que entra o sale de cada tejido; y k_{met} y k_{ren} representan las constantes de eliminación de primer orden por metabolismo y excreción renal, respectivamente.

El modelo farmacocinético compartimental más sencillo es el modelo monocompartimental, en el que existe un único compartimento al que llega y desde el que se elimina el fármaco. Sin embargo, los modelos compartimentales pueden tener una complejidad creciente en función del número de compartimentos (modelos multicompartmentales) y de la forma en que dichos compartimentos están interconectados entre sí, que tendrá que estimarse a partir de los datos disponibles. El número de compartimentos incluidos en el modelo farmacocinético dependerá de las características cinéticas del fármaco y del diseño experimental.^{157, 158} En general, con estos modelos no se suelen diferenciar más de tres grupos de compartimentos: *i*) tejidos en los que el fármaco se distribuye rápidamente y que son indistinguibles de la sangre (V1); *ii*) tejidos en los que el fármaco se distribuye rápidamente (V2), pero no de forma tan rápida como los tejidos del V1; y *iii*) tejidos en los que el fármaco se distribuye de forma lenta (V3).

Teniendo en cuenta únicamente el modelo farmacocinético, y englobando el conjunto de parámetros farmacocinéticos del individuo *i* dentro de vector PK_i , la evolución temporal de las concentraciones de un fármaco puede describirse del siguiente modo:

$$Y_{ij} = f(D_i, PK_i, t_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad \text{eq. (1)}$$

donde Y_{ij} representa las observaciones al tiempo t_j en el individuo i ; f , representa la estructura del modelo; D_i , es la dosis de fármaco administrada y ε_{ij} , representa la diferencia residual entre el valor predicho por el modelo y el observado para el individuo i en el tiempo j .

Es importante destacar que, en este punto del desarrollo del modelo, los parámetros farmacocinéticos estimados en el individuo i serán los parámetros farmacocinéticos medios de la población, y serán los mismos para todos los individuos (ausencia de variabilidad interindividual).

4.3.1.2.- Modelo de covariables

Uno de los objetivos del análisis farmacocinético poblacional es poder identificar aquellas características de los individuos (covariables) que pueden explicar parte de la variabilidad cinética observada entre diferentes individuos de la población.¹⁵¹

Una covariable se define como aquella característica específica de un individuo que puede afectar al comportamiento del fármaco a través de un cambio en sus parámetros cinéticos.^{151, 159} Las covariables pueden clasificarse como factores intrínsecos, heredados o genéticamente determinados (p.ej: edad, sexo, peso, etc.), o factores extrínsecos, susceptibles de ser influidos por factores ambientales (p.ej: grado de adherencia al tratamiento, tabaquismo, presencia de enfermedades, administración de otros fármacos, etc.). Además, las covariables también se pueden dividir en continuas (p.ej: edad), discretas o categóricas (p.ej: raza) y dicotómicas (p.ej: sexo).

Establecer la relación entre las covariables y los parámetros cinéticos de forma cuantitativa es de gran interés en el desarrollo de un modelo poblacional.^{158, 160, 161} La introducción de las covariables en el modelo conduce a una disminución en la variabilidad interindividual de los parámetros, lo que permite estimar los parámetros individuales de un modo más aproximado y, finalmente, hace posible una dosificación

del fármaco de un modo individualizado, en función de las características de cada paciente en particular.

Tras seleccionar el grupo de covariables que pueden tener una relación con los parámetros cinéticos del modelo, la forma en la que el parámetro de interés cambia dependiendo de los valores de las covariables se puede modelar mediante diferentes expresiones matemáticas, dependiendo de las características de cada una de las covariables (continua, discreta, dicotómica) y de su influencia en el parámetro.¹⁶² Por ejemplo:

$$p_i = \theta_1 + (\theta_2 \times COV) \quad \text{eq. (2)}$$

donde p_i es el valor del parámetro p en el individuo i , θ_1 representa el valor del parámetro cuando la covariable (COV) toma el valor 0, y θ_2 representa el cambio en el parámetro por cada unidad de cambio en la COV .

Durante la fase de incorporación de las covariables en el modelo, que lleva al desarrollo del modelo final, el grado de la mejoría del ajuste de los datos por la adición de cada nuevo factor se evalúa mediante diversos criterios estadísticos. Así, una covariable únicamente será incorporada al modelo si satisface los requerimientos estadísticos previamente establecidos. Sin embargo, la construcción del modelo no se verá concluida hasta que el modelo completo sea sometido a un proceso de reajuste que, mediante una estrategia de eliminación de las covariables y utilizando criterios estadísticos más restrictivos, confirme que la influencia de cada covariable sobre el perfil cinético del fármaco es realmente significativa y que, por tanto, deba permanecer en el modelo (Figura 7).^{151, 159, 163}

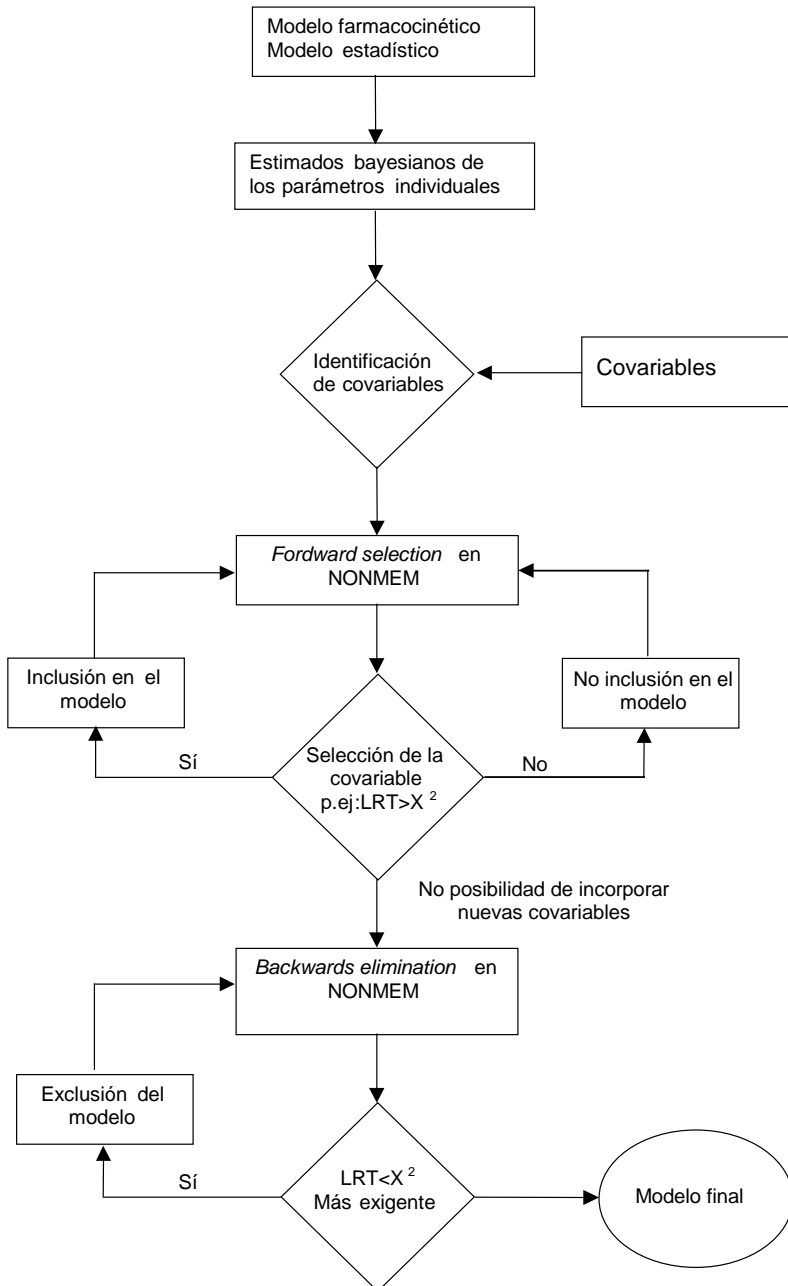


Figura 7. Diagrama de desarrollo de un modelo de covariables (reproducido de la ref. 161).

LRT: likelihood ratio test; X^2 : test chi cuadrado

Así, si además del modelo farmacocinético consideramos el modelo de covariables, las observaciones individuales pueden representarse por la función

$$Y_{ij} = f(D_i, PK_i, t_{ij}, X_i) + \varepsilon_{ij} \quad \text{eq. (3)}$$

donde X_i son las covariables que influyen en los parámetros farmacocinéticos.

A diferencia de lo que ocurría en la eq. (1), tras la introducción del modelo de covariables en el modelo poblacional, los parámetros cinéticos de cada individuo pueden variar y ser calculados en función de los valores de las covariables y de la magnitud en que dichas covariables influyen en los parámetros.

4.3.2.- Modelo estadístico

Los parámetros de efectos aleatorios de un modelo poblacional (modelo estadístico) permiten no sólo cuantificar la variabilidad de los parámetros cinéticos dentro de una población, sino también, calcular los parámetros cinéticos individuales mediante el uso de estimaciones bayesianas,¹⁵⁰ lo que resulta de gran interés para poder explorar la influencia de las covariables en la cinética del fármaco.

Podemos diferenciar dos fuentes de variabilidad cinética en una población: la variabilidad interindividual y la variabilidad intraindividual (Figura 8).^{151, 152}

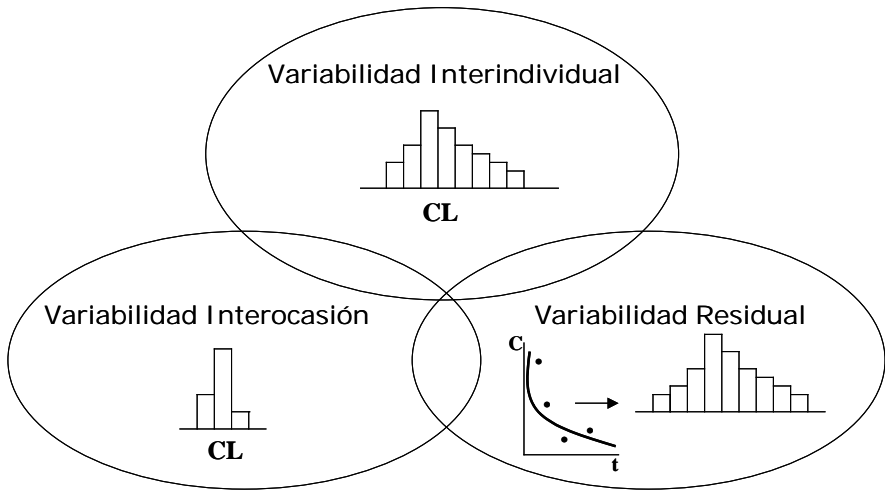


Figura 8. Representación esquemática del modelo estadístico de un modelo poblacional.

4.3.2.1.- Variabilidad interindividual

Es la variabilidad en los parámetros cinéticos observada entre diferentes individuos de la población (Figura 8). Considerando p_i como un valor dentro del vector PK_i , que representa los valores de los parámetros individuales del individuo i , este elemento puede expresarse del siguiente modo:^{151, 152}

$$p_i = \theta_{p,pop} * e^{\eta_{pi}} \quad \text{eq. (4)}$$

donde $\theta_{p,pop}$ representa el valor típico (o medio) poblacional de los parámetros, común a todos los individuos de la población, y η_{pi} es la desviación del valor de p_i con respecto a $\theta_{p,pop}$. Si la población cuenta con un número m de individuos, los valores $\eta_{p1}, \eta_{p2}, \eta_{p3}, \dots, \eta_{pm}$ representan la desviación de los parámetros de cada individuo respecto al valor medio poblacional. Esta desviación tiene una

distribución aleatoria, simétricamente distribuida alrededor del valor 0 y con una varianza igual a ω_p^2 . El valor de ω_p^2 representa la variabilidad interindividual asociada al parámetro p .

La elección de cómo modelar la variabilidad interindividual se basa en las características de los datos. Sin embargo, uno de los modelos más frecuentemente empleados para este fin es el modelo exponencial (eq. 4), que implica que los parámetros individuales seguirán una distribución log-normal y que no alcanzarán valores negativos, lo que se ajusta a lo esperable desde el punto de vista fisiológico.^{151, 152}

Como el vector PK_i no contiene un único elemento, los diferentes parámetros farmacocinéticos p , q , r , etc. también pueden tener asociada su variabilidad interindividual ω_p^2 , ω_q^2 , ω_r^2 , etc. La matriz de varianza-covarianza O engloba en posición diagonal las varianzas ω_p^2 , ω_q^2 , ω_r^2 , etc.

4.3.2.2.- Variabilidad intraindividual

Las características farmacocinéticas de un individuo pueden cambiar a lo largo del tiempo debido a múltiples causas. Los cambios cinéticos pueden acontecer tras largos periodos de tiempo, como consecuencia del envejecimiento o de cambios en el peso, por ejemplo; o incluso en el mismo día, en función de la dieta o de la administración de otros fármacos, entre otros. No obstante, estos cambios son predecibles y pueden ser descritos mediante un cambio en las covariables que afectan a la farmacocinética del agente en estudio. Sin embargo, el motivo de los cambios de los parámetros cinéticos de un individuo permanece desconocido en muchos casos. Es lo que se agrupa bajo el término de variabilidad intraindividual .

4.3.2.2.1.- Variabilidad interocasión

La variabilidad interocasión representa la variabilidad en los parámetros cinéticos de un individuo cuando se realizan observaciones en diferentes ocasiones (Figura 8).¹⁵¹ Esta fuente de variabilidad cuantifica la desviación de los parámetros de un individuo calculados en cada ocasión respecto a su valor medio individual y, como ocurre con el resto de parámetros aleatorios, su distribución es al azar, simétricamente distribuida alrededor del valor 0 y con una varianza igual a κ_p^2 .

Para el desarrollo de un modelo poblacional es importante poder contar con observaciones realizadas en diferentes ocasiones, al menos en un subgrupo de los individuos. De otro modo, la variabilidad interocasión será erróneamente imputada a la variabilidad interindividual de los parámetros o al error residual, lo que finalmente conducirá a un sesgo en los parámetros estimados y a errores en la capacidad del modelo para predecir las concentraciones del fármaco a nivel individual.^{151, 164, 165}

Considerando p_i como los valores individuales del parámetro p en el individuo i , que tienen una variabilidad interindividual representada por η_{pi} , la variabilidad interocasión puede expresarse del siguiente modo:

$$p_i = \theta_{p,pop} * e^{\eta_{pi} + k_1 OCA_1 + k_2 OCA_2 + \dots + k_n OCA_n} \quad \text{eq. (5)}$$

donde κ_1 es la desviación de p_i respecto al valor medio poblacional ($\theta_{p,pop}$) en la ocasión 1, κ_2 es la desviación de p_i respecto $\theta_{p,pop}$ en la

ocasión 2, etc. OCA_n toma el valor de 1 si la observación se realizó en la ocasión n , y el valor 0 en el resto de ocasiones.

4.3.2.3.- Variabilidad residual

Como ya se ha comentado, el objetivo de un modelo farmacocinético poblacional es poder describir el curso temporal de las concentraciones de un fármaco en cada individuo tras su administración, de modo que las diferencias entre las concentraciones predichas por el modelo y las concentraciones realmente observadas sea lo menor posible. La variabilidad residual de un modelo (ε), también conocida como error residual, cuantifica la desviación entre las concentraciones predichas por el modelo y las concentraciones realmente observadas en el individuo que no se puede explicar mediante el modelo poblacional propuesto (Figura 8). Esta desviación se puede deber a variabilidad intraindividual, a errores en la técnica de determinación de las concentraciones del fármaco, a cambios en la adherencia al tratamiento por parte del paciente, a errores en el proceso de desarrollo del modelo, etc.¹⁶¹ De igual forma que la variabilidad interindividual y que la variabilidad interocasión, la variabilidad residual tiene una distribución aleatoria alrededor del valor 0 y con una varianza σ^2 .¹⁴⁰

El error residual de un modelo poblacional puede representarse mediante diferentes funciones:^{151, 161, 166}

Modelo de error aditivo

$$Y_{ij} = \mu_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad \text{eq. (6)}$$

Modelo de error proporcional

$$Y_{ij} = \mu_{ij} (1 + \varepsilon_{ij}) \quad \text{eq. (7)}$$

Modelo de error exponencial

$$Y_{ij} = \hat{y}_{ij} * e^{\varepsilon_{ij}} \quad \text{eq. (8)}$$

Modelo de error combinado (aditivo y proporcional)

$$Y_{ij} = \hat{y}_{ij} (1 + \varepsilon_{ij1}) + \varepsilon_{ij2} \quad \text{eq. (9)}$$

donde Y_{ij} es la concentración observada en el individuo i en el punto de tiempo j , \hat{y}_{ij} es la concentración del fármaco predicha por el modelo para el individuo i al tiempo j , y ε_{ij} representa la diferencia residual entre el valor predicho por el modelo y el observado para el individuo i en el tiempo j .

Estimar correctamente la magnitud de la variabilidad residual es de gran importancia en el desarrollo de un modelo poblacional, ya que la eficacia y la seguridad de un fármaco disminuyen a medida que la variabilidad residual aumenta. Una elevada variabilidad residual se traduce en una elevada probabilidad de que las concentraciones del fármaco se sitúen fuera del intervalo terapéutico, lo que, a nivel clínico, puede resultar en un aumento del riesgo de que el tratamiento no sea eficaz o de que el paciente desarrolle acontecimientos adversos no deseados.

La inter-relación entre los parámetros de efectos fijos y aleatorios de un modelo farmacocinético poblacional se muestra en la figura 9.

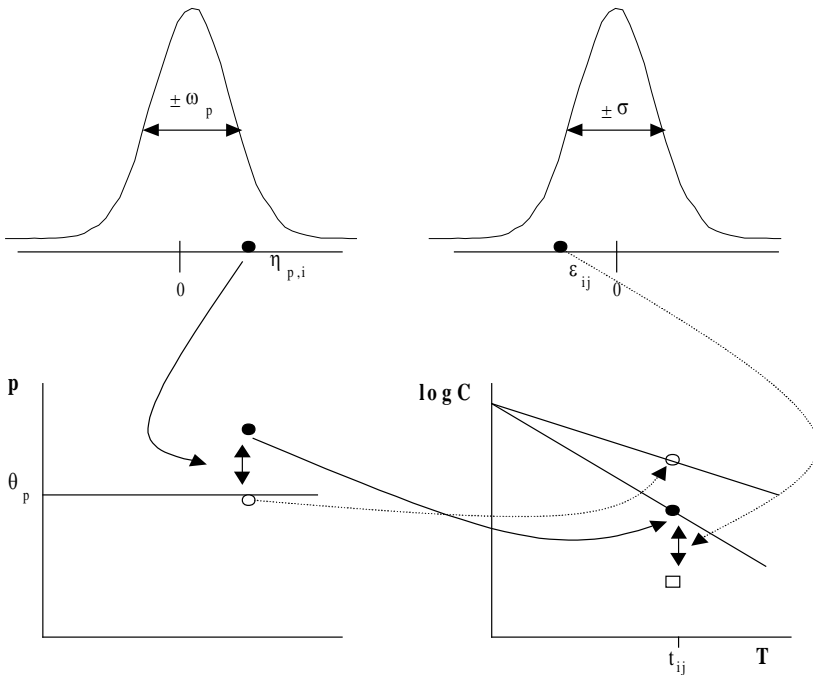


Figura 9. Inter-relación entre los parámetros de efectos fijos y aleatorios de un modelo poblacional. En los paneles inferiores, los círculos vacíos representan el valor típico poblacional de un parámetro p (panel izquierdo) y el valor teórico de la concentración plasmática predicha (panel derecho). Los círculos negros representan las mismas entidades para el individuo i , con un valor de p_i igual a $\theta_p * e^{\eta_{p,i}}$. El símbolo cuadrado en el panel inferior derecho representa el valor observado a tiempo j para el individuo i , cuya diferencia con el valor predicho por el modelo se corresponde con el valor ϵ_{ij} .

Disponer de modelos farmacocinéticos poblacionales de los IP resulta de gran interés para poder modificar las dosis de los mismos de un modo más dirigido y efectivo que si se realizara de un modo empírico. Mediante el empleo de estos modelos sería posible individualizar la dosis de los IP en función de la C_{valle} deseada y de las características específicas de cada individuo poco después o incluso antes de que el paciente comience a recibir el fármaco (mediante la realización de simulaciones). Este aspecto es de gran importancia, teniendo en cuenta que la exposición subóptima a los antirretrovirales puede conducir a la aparición de resistencias virales en un breve plazo de

tiempo. Por otro lado, la aplicación de estos modelos podría prevenir una exposición demasiado elevada a los fármacos, lo que podría evitar parte de la toxicidad derivada del tratamiento antirretroviral. En el caso de un modelo de lopinavir, que es co-formulado con dosis bajas de ritonavir para inhibir su metabolismo hepático (ver apartado 5.1), caracterizar adecuadamente la interacción entre ambos compuestos resulta de gran importancia para poder predecir de un modo fiable el curso temporal de la concentración plasmática de lopinavir en la práctica clínica.

5.- Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de lopinavir

Lopinavir es un fármaco inhibidor de la proteasa del VIH-1 y VIH-2, que impide la división de la poliproteína gag-pol resultante de la traducción del DNA viral, dando lugar a la producción de partículas virales inmaduras sin capacidad infecciosa.¹⁶⁷

5.1.- Propiedades farmacocinéticas

Una característica diferencial de lopinavir respecto al resto de los fármacos inhibidores de la proteasa del VIH reside en el hecho de su co-formulación con dosis bajas de ritonavir, que actúa inhibiendo el metabolismo hepático de lopinavir. Por ello, a menos que se especifique lo contrario, las características farmacocinéticas de lopinavir que se presentan a continuación se refieren siempre a las descritas en presencia de ritonavir.

5.1.1.- Absorción

Aunque no existen estudios en humanos en los que se haya determinado la biodisponibilidad oral de lopinavir, estudios en

animales demuestran que lopinavir posee una escasa biodisponibilidad oral cuando se administra aisladamente.¹⁶⁸

En estudios en voluntarios sanos, la concentración máxima de lopinavir en plasma apenas excedió 0,1 mg/L tras la administración de una dosis única de 400 mg de lopinavir, y disminuyó a menos de 0,01 mg/L a partir de las 8 horas post-dosis.¹⁶⁸ Sin embargo, la administración de la misma dosis de lopinavir conjuntamente con 50 mg de ritonavir se tradujo en un importante aumento de la exposición a lopinavir. En este caso, la concentración máxima de lopinavir (media \pm desviación estándar) fue de $5,5 \pm 2,0$ mg/L, el AUC_{0-24} aumentó 77 veces, y la concentración de lopinavir 12 horas tras su administración fue 30 veces superior a la CI_{50} de las cepas virales *wild-type* (Figura 10).

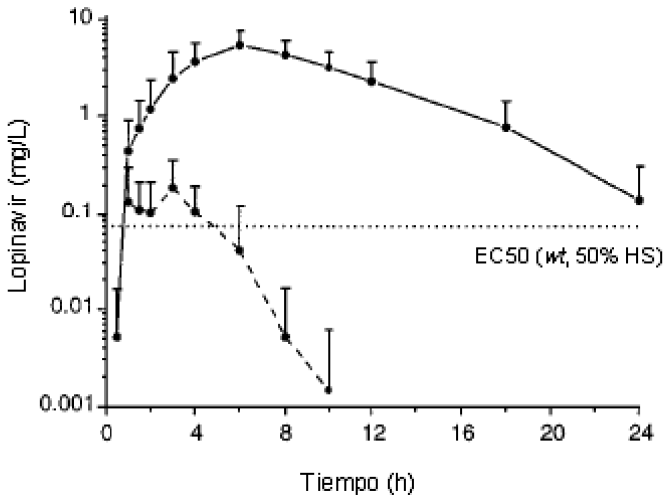


Figura 10. Concentración plasmática de lopinavir en voluntarios sanos tras la administración de una dosis única de 400 mg de lopinavir con (línea continua) o sin (línea discontinua) 50 mg de ritonavir (reproducido de la ref. 168)

En estado de equilibrio estacionario, lopinavir (cápsulas blandas) posee una absorción oral rápida, con una constante de absorción (k_a) de aproximadamente $0,5 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo en alcanzar la C_{\max} que oscila entre 2 y 4 horas tras la administración.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Tras tres semanas en tratamiento con lopinavir/ritonavir a dosis de 400/100 mg cada 12 horas (cápsulas blandas) en un grupo de pacientes infectados por el VIH, la C_{\max} , la C_{\min} y el AUC_{0-12} de lopinavir (media \pm desviación estándar) fueron $9,8 \pm 3,7 \text{ mg/L}$, $5,5 \pm 2,7 \text{ mg/L}$ y $185,2 \pm 73,4 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$, respectivamente.¹⁷¹

Recientemente se ha aprobado una nueva formulación de lopinavir/ritonavir en comprimidos para el tratamiento de los pacientes infectados por el VIH que ha demostrado producir una exposición a lopinavir y a ritonavir equivalente a la observada con la anterior formulación en cápsulas blandas.^{172, 173} Tras la administración de una dosis única de lopinavir/ritonavir de 400/100 mg con una comida con moderado contenido graso, el AUC_{0-12} y la C_{\max} de lopinavir aumentaron un 18 y un 23% usando la formulación en comprimidos en lugar de las cápsulas.

La absorción oral de lopinavir se ve influenciada por la presencia de alimentos. Tras la administración de una dosis única de lopinavir/ritonavir 400/100 mg (cápsulas blandas) con una comida con moderado contenido graso (500-682 kcal, 23-25% grasa), el AUC_{0-12} y la C_{\max} de lopinavir aumentaron un 48% y un 23%, comparado con la administración de la misma dosis en ayunas. Estas diferencias fueron aún más acentuadas en el caso de la formulación de lopinavir/ritonavir en solución oral.^{172, 174} Por el contrario, la influencia de los alimentos en la absorción oral de lopinavir es menor con la formulación de lopinavir/ritonavir en comprimidos que con la

formulación en cápsulas o con la solución oral. Así, no se han observado diferencias significativas en la exposición a lopinavir o a ritonavir entre la administración de la formulación en comprimidos en ayunas y la administración de la formulación en cápsulas blandas con una comida con moderado contenido graso.¹⁷³

5.1.2.- Distribución

En estado de equilibrio estacionario, el volumen de distribución de lopinavir se ha estimado en 61-67 L.^{169, 170} Además, lopinavir se une a las proteínas plasmáticas en un 98-99%, mayoritariamente a la albúmina y a la α_1 -glicoproteína ácida, siendo mayor su afinidad por esta última.^{175, 176}

Lopinavir se acumula intracelularmente, con un cociente entre las concentraciones intracelulares y las plasmáticas que varía entre 1,2 y 4,1, según diferentes estudios.^{130, 177, 178} Tras la administración de dosis repetidas de 400/100 mg de lopinavir/ritonavir cada 12 horas en pacientes infectados por el VIH, la mediana de la C_{valle} intracelular de lopinavir en linfocitos de sangre periférica fue de 10 mg/L (rango intercuartílico 8,3-13,9).¹⁷⁷

Lopinavir atraviesa la barrera hematoencefálica, alcanzando una concentración en líquido cefalorraquídeo que se sitúa en torno a la concentración de lopinavir libre en plasma.^{179, 180} Así, la media de la C_{min} de lopinavir en líquido cefalorraquídeo en un grupo de 26 pacientes infectados por el VIH en tratamiento con lopinavir/ritonavir a dosis de 400/100 mg cada 12 horas fue de 17 $\mu\text{g/L}$ (rango intercuartílico 12,1-22,7).¹⁷⁹

5.1.3.- Metabolismo y eliminación

Lopinavir sufre un metabolismo oxidativo por el sistema hepático del citocromo P450. Estudios *in vitro* en microsomas humanos demuestran que lopinavir es metabolizado casi exclusivamente por el isoenzima CYP3A4, y que este proceso es inhibido por ritonavir de un modo concentración-dependiente, con una concentración inhibitoria del 50% del metabolismo de lopinavir estimada en $0,073\mu\text{M}$ (Figura 11).¹⁶⁸

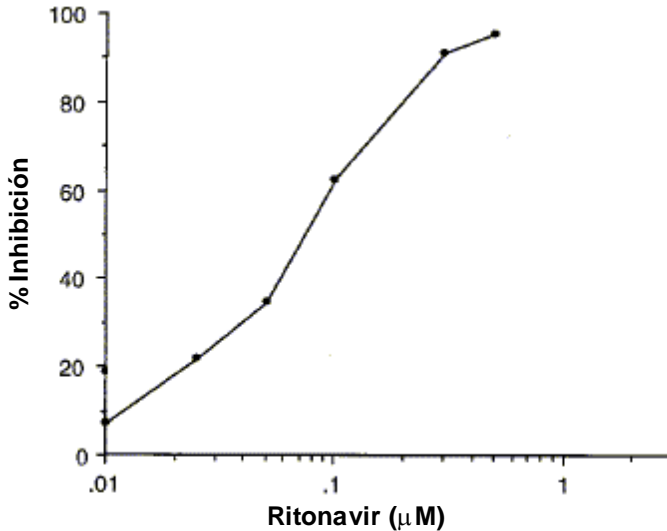


Figura 11. Inhibición del metabolismo de lopinavir por ritonavir en estudios *in vitro* en microsomas humanos (adaptado de la ref. 168)

Tras la administración de una dosis única de ^{14}C -lopinavir/ritonavir en voluntarios sanos, el 89% de la radioactividad en plasma procedía del fármaco original. La eliminación de lopinavir no metabolizado así como la de sus metabolitos se produce fundamentalmente por vía fecal. Así, el 24% de la dosis de lopinavir no metabolizado se

recuperó en las heces, con el resto de la radioactividad proviniendo de diferentes metabolitos, mientras que únicamente menos de un 2% de la dosis se eliminó sin metabolizar por la orina.¹⁸¹

Lopinavir es un inductor del metabolismo de ritonavir.¹⁸² Además, ritonavir induce enzimas metabólicas, dando como resultado la inducción de su propio metabolismo.¹⁸³ Como resultado, la C_{valle} de lopinavir y de ritonavir disminuyen tras la administración de dosis repetidas de lopinavir/ritonavir durante el inicio del tratamiento, estabilizándose tras 10 días a 2 semanas. En estado de equilibrio estacionario, el aclaramiento de lopinavir se ha estimado en 4-8 L/h.^{169, 170, 172, 184, 185}

5.1.4.- Poblaciones especiales

5.1.4.1.- Insuficiencia hepática

No se han observado diferencias en la C_{valle} de lopinavir entre pacientes infectados por el VIH con o sin co-infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en ausencia de cirrosis hepática.^{186, 187}

En presencia de insuficiencia hepática el AUC_{0-12} , la C_{max} y la C_{min} de lopinavir y ritonavir pueden aumentar de modo significativo. Así, el AUC_{0-12} , la C_{max} y la C_{min} de lopinavir aumentaron un 30%, un 20% y un 79%, respectivamente, en un grupo 12 de pacientes co-infectados por el VIH y el VHC con insuficiencia hepática leve o moderada, comparado con un grupo control de pacientes infectados únicamente por el VIH sin disfunción hepática.¹⁸⁸ Además, como consecuencia de una disminución de la fijación del lopinavir a las proteínas plasmáticas, la fracción libre de lopinavir en plasma fue significativamente superior en los pacientes con insuficiencia hepática

leve ($0,89 \pm 0,21\%$) o moderada ($0,94 \pm 0,10\%$) comparado con el grupo control ($0,69 \pm 0,06\%$).¹⁸⁸ En consecuencia, actualmente se recomienda usar lopinavir/ritonavir con precaución en los pacientes infectados por el VIH que presentan disfunción hepática, aunque no se ha especificado la necesidad de reducir las dosis de lopinavir/ritonavir en este contexto.¹⁷²

5.1.4.2.- Población pediátrica

Aunque los datos sobre la farmacocinética de lopinavir/ritonavir en niños menores de 6 meses son escasos, se ha descrito un marcado descenso de la vida media de lopinavir en este grupo de pacientes, lo que puede conducir a una C_{valle} de lopinavir por debajo de la concentración mínima efectiva.^{189, 190} Sin embargo, la exposición a lopinavir en un grupo de pacientes pediátricos que recibieron tratamiento con lopinavir/ritonavir a dosis de $230/57,5 \text{ mg/m}^2$ dos veces al día o de $300/75 \text{ mg/m}^2$ dos veces al día cuando se administraba conjuntamente con nevirapina fue similar a la alcanzada en la población adulta con la dosis de lopinavir/ritonavir $400/100 \text{ mg}$ dos veces al día.¹⁹¹

5.1.4.3.- Gestación

La exposición a lopinavir puede disminuir con el transcurso de la gestación. Sin embargo, los diferentes estudios realizados en este sentido muestran resultados contradictorios y no existen directrices claras sobre la necesidad de aumentar la dosis de lopinavir/ritonavir durante el embarazo.^{172, 192-194} Algunos estudios apuntan hacia una exposición inadecuadamente baja a lopinavir durante el tercer trimestre de la gestación cuando se administra a dosis estándar. No obstante, otros estudios mostraron como la media de la C_{valle} de

lopinavir era superior a la CI_{50} ajustada por la unión a las proteínas plasmáticas de las cepas virales *wild-type* durante el tercer trimestre del embarazo en un grupo de mujeres embarazadas que recibieron una dosis de lopinavir/ritonavir de 400/100 mg (C_{valle} 3,7 mg/L) o 533/133 mg (C_{valle} 4,5 mg/L) dos veces al día (cápsulas blandas),¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ así como cuando recibieron lopinavir/ritonavir a una dosis de 600/150 mg (C_{valle} 4,7 mg/L) dos veces al día (comprimidos).¹⁹⁴

Lopinavir atraviesa la barrera placentaria, con una concentración media en sangre de cordón umbilical de que oscila entre 0,45 y 1,1 mg/L, según diferentes estudios.^{193, 196}

5.1.5.- Interacciones farmacológicas

Ritonavir es un inductor/inhibidor del citocromo P450, con predominio de su efecto inhibidor. Como consecuencia, es posible un aumento de las concentraciones plasmáticas de otros medicamentos que se metabolizan fundamentalmente por el CYP3A cuando son co-administrados con lopinavir/ritonavir (p.ej: inhibidores de la HMG-CoA reductasa como la atorvastatina,¹⁹⁸ benzodiazepinas como el midazolam,¹⁹⁹ antiarrítmicos como la amiodarona,¹⁷² inhibidores de la fosfodiesterasa como el sildenafil,¹⁷² itraconazol y otros antifúngicos,¹⁷² etc.), lo que puede tanto intensificar o prolongar su efecto terapéutico como favorecer la aparición de acontecimientos adversos.

Además, lopinavir/ritonavir también puede aumentar la biotransformación de algunos fármacos que son metabolizados por las enzimas del citocromo P450 y por glucuronidación (p.ej: metadona,²⁰⁰ voriconazol,¹⁷² etinilestradiol,¹⁷² etc), lo que puede

resultar en una reducción de sus concentraciones plasmáticas y en la consiguiente disminución de su eficacia.

Por otra parte, un elevado número de fármacos pueden actuar como inductores de la actividad del isoenzima CYP3A4 del citocromo P450 (p.ej: rifampicina,²⁰¹ rifabutina,¹⁷² *Hypericum perforatum*,¹⁷² efavirenz,¹²¹ nevirapina,¹⁷² amprenavir,^{202, 203} anticomiciales como la carbamazepina¹⁷² o la fenitoína,²⁰⁴ etc.), responsable del metabolismo de lopinavir y ritonavir, lo que contribuye a disminuir la concentración plasmática de lopinavir y a aumentar su variabilidad, lo que, finalmente, puede comprometer la eficacia del tratamiento antirretroviral.

5.2.- Propiedades farmacodinámicas

5.2.1.- Actividad antirretroviral *in vitro*

Se ha evaluado la actividad antirretroviral de lopinavir *in vitro* en células MT4 infectadas por el VIH-1,¹⁶⁸ demostrando una inhibición del 93% de las cepas virales *wild-type* a una concentración 0,5 nM. La CI_{50} de lopinavir frente a cepas virales *wild-type* en ausencia y en presencia de suero humano al 50% fue de 17 ± 4 nM y de 102 ± 44 nM, respectivamente. Estos resultados se reprodujeron en linfocitos de sangre periférica infectados por cepas virales procedentes de pacientes, con una CI_{50} de 6,5 nM (4-11) en ausencia de suero humano. Además, cuando se evaluó su actividad frente a cepas virales con mutaciones relacionadas con resistencia en el gen de la proteasa, lopinavir demostró tener una mayor actividad antirretroviral que ritonavir, lo que pone de manifiesto su mayor barrera genética.¹⁶⁸

5.2.2.- Actividad antirretroviral *in vivo*

La concentración plasmática de ritonavir a las dosis de lopinavir/ritonavir empleadas en la clínica es inferior al 7% de las concentraciones obtenidas con la dosis de 600 mg dos veces al día, por lo que la actividad antirretroviral de lopinavir/ritonavir se debe a lopinavir.

5.2.2.1.- Pacientes sin experiencia antirretroviral previa (naïve)

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la actividad antirretroviral intrínseca de lopinavir en los pacientes infectados por el VIH sin experiencia antirretroviral previa. Se han descritos descensos en la carga viral plasmática de más de un logaritmo en pacientes que recibieron lopinavir/ritonavir en monoterapia a dosis de 400/100 mg cada 12 horas durante dos semanas,²⁰⁵ así como unas tasas de respuesta virológica (carga viral < 50 copias/mL) que superan el 80% tras 48 semanas de seguimiento y que son comparables a las alcanzadas con esquemas convencionales de TARGA con lopinavir/ritonavir más dos ITIAN.²⁰⁶⁻²¹¹ Como resultado de esta elevada potencia antirretroviral, el tratamiento con lopinavir/ritonavir se traduce en una mejora inmunológica de los pacientes, con marcados incrementos del recuento de linfocitos CD4.²⁰⁵⁻²¹¹ Además, estos beneficios derivados del tratamiento con lopinavir/ritonavir se mantienen a largo plazo.^{212, 213}

Por otra parte, el riesgo de desarrollar mutaciones virales que confieren resistencia a los antirretrovirales en los pacientes en los que no se consigue suprimir la replicación viral es menor en los sujetos tratados con lopinavir/ritonavir que en los tratados con IP no potenciados con ritonavir o con ITINAN.^{208, 210, 214} Por ejemplo, en el

estudio M98-863,²⁰⁸ en el que se comparó el tratamiento antirretroviral con lopinavir/ritonavir o con nelfinavir en pacientes naïve, ninguno de los pacientes tratados con lopinavir/ritonavir en los que no se logró mantener la supresión completa de la carga viral presentaron mutaciones en el gen de la proteasa tras el fracaso virológico, comparado con el 33% de los pacientes que recibieron nelfinavir. De igual modo, la aparición de la mutación M184V en el gen de la transcriptasa inversa fue menos frecuente en los pacientes que fracasaron a lopinavir/ritonavir (41%) que en los pacientes que fracasaron al tratamiento con nelfinavir (82%).²⁰⁸

5.2.2.2.- Pacientes con experiencia antirretroviral previa (tratamiento de rescate)

Para que tenga lugar la pérdida completa de la actividad antirretroviral de lopinavir es necesario que se acumulen varias mutaciones relacionadas con resistencia al mismo en el gen de la proteasa viral.²¹⁵ Esta elevada barrera genética hace que lopinavir/ritonavir pueda ser de utilidad para el tratamiento de los pacientes infectados por el VIH en situación de fracaso virológico a pesar de recibir tratamiento antirretroviral. No obstante, el grado de exposición previo de los pacientes a los fármacos antirretrovirales puede condicionar de un modo importante la probabilidad de obtener la supresión completa de la replicación viral en este contexto.

Se han descrito tasas de respuesta virológica al tratamiento con lopinavir/ritonavir que oscilan entre el 60 y el 70% tras 48 semanas de tratamiento en pacientes con experiencia antirretroviral previa limitada, naïve a lopinavir y en muchos casos expuestos a sólo dos familias de fármacos antirretrovirales anteriormente.^{121, 216-218} Por el contrario, en estudios realizados en pacientes con una amplia

experiencia antirretroviral, que han recibido tratamiento con al menos tres familias de antirretrovirales y que, en muchas ocasiones, ya han sido previamente tratados con lopinavir/ritonavir, la proporción de pacientes que logra mantener la carga viral indetectable durante el primer año de seguimiento es tan sólo de un 20-50%.^{38, 40, 219, 220}

5.2.2.2.1.- Predictores de respuesta al tratamiento de rescate con lopinavir/ritonavir

El grado de resistencia viral en el momento de iniciar el tratamiento, aspectos farmacocinéticos relacionados con la exposición a lopinavir y la combinación de ambos (cociente inhibitorio) son factores clínicamente relevantes a la hora de predecir la respuesta virológica al tratamiento con lopinavir/ritonavir en los pacientes con experiencia antirretroviral previa.

Aunque, como ya se ha comentado, la aparición de resistencia a lopinavir en los pacientes naïve que inician un primer esquema de tratamiento antirretroviral que incluye lopinavir/ritonavir es excepcional, existe una serie de mutaciones el gen de la proteasa del virus que se relacionan con una reducción de la sensibilidad viral a lopinavir. Así, diversos estudios han tratado de identificar las mutaciones del gen de la proteasa relacionadas con un aumento de la CI_{50} de lopinavir²²¹⁻²²³ y, por tanto, con un aumento del riesgo del fracaso del tratamiento con lopinavir /ritonavir.²¹⁵

Aunque se han identificado más de 10 mutaciones en el gen de la proteasa que se relacionan con resistencia a lopinavir, la pérdida completa de su actividad antirretroviral es un fenómeno escalonado en el que la suma de cada nueva mutación se traduce en un incremento progresivo de la CI_{50} del fármaco. Como resultado, para

que tenga lugar un aumento del riesgo del fracaso del tratamiento con lopinavir/ritonavir es necesario que el número de mutaciones relacionadas con resistencia a lopinavir supere 3-8,^{75, 118, 119, 215, 223-226} o que la CI_{50} del virus del paciente sobrepase en más de 10-40 veces la CI_{50} del virus *wild-type*.^{121, 225}

Otro factor que influye en la probabilidad de éxito del tratamiento antirretroviral con lopinavir/ritonavir es la exposición al fármaco. En un estudio observacional realizado por Boffito *et al*,²²⁷ la probabilidad de lograr la supresión mantenida de la carga viral en un grupo de 37 pacientes con amplia exposición previa a IP que recibieron tratamiento de rescate con lopinavir/ritonavir fue mayor cuando la C_{valle} de lopinavir superaba 5,7 mg/L (odds ratio 17,7, intervalo confianza 95% 1,1-39,6). Esta asociación también ha sido descrita por otros autores,^{75, 118, 119} aunque no de un modo consistente.^{121, 226} Ante la falta de concordancia entre los estudios, se ha propuesto la utilización del cociente inhibitorio, como un índice que combine información farmacológica y sobre la resistencia viral.

La capacidad del IQ de lopinavir para predecir la respuesta virológica al tratamiento de rescate con lopinavir/ritonavir se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios. En el estudio M98-957,¹²¹ la probabilidad de lograr la supresión de la carga viral tras 24 semanas de seguimiento se relacionó con el IQ fenotípico pero no con la C_{min} de lopinavir. Así, la proporción de pacientes con carga viral <400 copias/mL tras 24 semanas de seguimiento cuando el logaritmo del IQ fenotípico de lopinavir era >15, 4-15 o <4 fue 100, 80 y 70%, respectivamente (Figura 12).

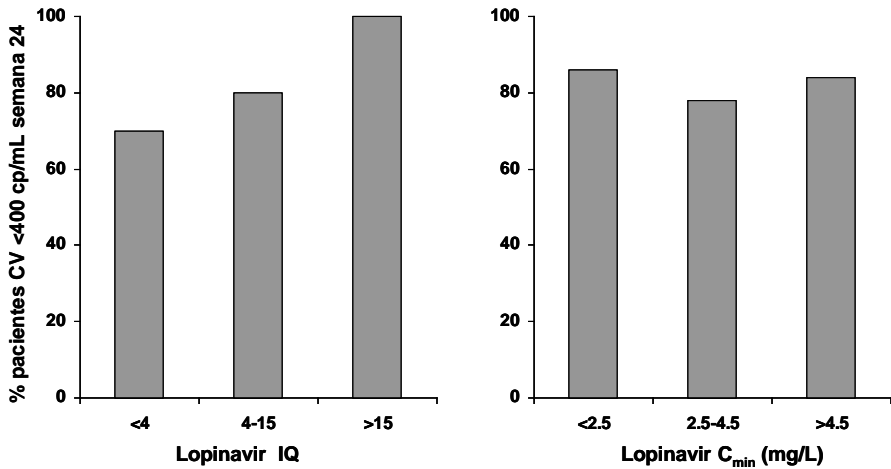


Figura 12. Respuesta virológica al tratamiento de rescate con lopinavir/ritonavir en función del cociente inhibitorio (IQ, panel izquierdo), o la concentración mínima (C_{\min} , panel derecho) de lopinavir. (reproducido de la ref. 121).

Del mismo modo, González de Requena *et al*¹¹⁸ encontraron una relación entre el IQ genotípico de lopinavir y la respuesta virológica al tratamiento de rescate con lopinavir/ritonavir en un estudio observacional que incluyó 126 pacientes. Según los resultados observados por los autores, los pacientes que presentaban un IQ genotípico de lopinavir superior a 0,7 tenían una probabilidad de responder virológicamente tras 12 semanas de seguimiento (descenso de la carga viral $\geq 1 \log_{10}$ copias/mL o carga viral <50 copias/mL) que era casi 5 veces superior a la de los pacientes con un IQ inferior a 0,7 (intervalo confianza 95% 1,3-16,8). Marcelin *et al*¹²⁰ obtuvieron resultados similares al estudiar los factores predictores de respuesta al tratamiento con lopinavir/ritonavir en una cohorte de 116 pacientes en situación de fracaso virológico a pesar de recibir TARGA con IP. En este estudio, la probabilidad de responder al tratamiento se relacionó tanto con el número de mutaciones en el gen de la

proteasa como con el IQ genotípico de lopinavir. Así, el 50% de los pacientes que tenían un IQ genotípico de lopinavir superior a 2125 presentaban una carga viral plasmática <400 copias/mL tras 24 semanas de seguimiento, comparado con sólo el 15% de los pacientes cuyo IQ era inferior a 1043. Los valores del IQ genotípico difieren notablemente entre los dos últimos estudios, lo que refleja las diferentes unidades en las que se expresó la C_{valle} de lopinavir así como las diferentes mutaciones en el gen de la proteasa consideradas para el cálculo del IQ en cada uno de los estudios. En un tercer estudio, Castagna *et al*¹¹⁹ evaluaron la capacidad del IQ de lopinavir de predecir la respuesta al tratamiento de rescate. En este estudio, los autores calcularon el IQ normalizado de lopinavir y estudiaron su relación con la probabilidad de presentar una carga viral plasmática <80 copias/mL tras 48 semanas de seguimiento en un grupo de 59 pacientes con una amplia experiencia antirretroviral previa. La respuesta al tratamiento se relacionó con el número de mutaciones en el gen de la proteasa, con la C_{valle} de lopinavir y con el IQ normalizado de lopinavir. Así, todos los pacientes cuyo IQ normalizado era mayor de 14 presentaban una carga viral <80 copias/mL a las 48 semanas de seguimiento, comparado con menos de la mitad de los pacientes cuyo IQ era menor o igual a 14.

Considerados en su conjunto, estos datos ponen de manifiesto cómo el IQ de lopinavir puede ser un mejor predictor de la evolución virológica en los pacientes que reciben tratamiento antirretroviral de rescate con lopinavir/ritonavir que considerar únicamente las mutaciones en el genoma viral o la C_{valle} de lopinavir. Por otra parte, también sugieren la posibilidad de poder mantener la actividad antirretroviral de lopinavir en aquellos pacientes con una sensibilidad disminuida al fármaco mediante el incremento de la exposición al mismo.²²⁸

HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas en los trabajos que conforman la presente tesis doctoral son las siguientes:

Estudio 1: Variability in Antiretroviral Agents Concentration in Plasma among HIV-Infected Adults in Routine Clinical Practice.

Considerando la incidencia del fracaso virológico en los pacientes infectados por el VIH que reciben tratamiento antirretroviral, así como la gran variabilidad interindividual de la concentración plasmática de los IP e ITINAN en ensayos clínicos bien controlados, es posible hipotetizar que dicha variabilidad será superior en la práctica clínica que en estudios controlados y, por ello, que la concentración de los antirretrovirales será inferior a la concentración mínima eficaz en una proporción importante de los pacientes.

Estudio 2: Lopinavir/Ritonavir Pharmacokinetics in HIV and Hepatitis C Virus Co-Infected Patients without Liver Function Impairment. Influence of Liver Fibrosis.

Al ser lopinavir y ritonavir dos fármacos de eliminación mayoritariamente hepática y que sufren efecto de primer paso, se hipotetiza que la co-infección por el virus de la hepatitis C y el grado de fibrosis hepática pueden influir de forma significativa en la farmacocinética de ambos fármacos en los pacientes infectados por el VIH, incluso en ausencia de insuficiencia hepática clínicamente evidente.

Estudio 3: Simultaneous Population Pharmacokinetic Model for Lopinavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults.

Basándonos en el conocimiento previo sobre la utilidad de los modelos farmacocinéticos poblacionales para otros fármacos antirretrovirales, hipotetizamos que el desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional de lopinavir puede ser de utilidad para predecir la evolución temporal de la concentración plasmática de lopinavir de forma individualizada en los pacientes infectados por el VIH en tratamiento con lopinavir/ritonavir.

La incorporación de la influencia de ritonavir en la farmacocinética de lopinavir en dicho modelo, de un modo concentración-dependiente, disminuirá el error del modelo farmacocinético en la predicción de las concentraciones individuales de lopinavir.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en los trabajos que configuran la presente tesis doctoral son los siguientes:

Estudio 1: Variability in Antiretroviral Agents Concentration in Plasma among HIV-Infected Adults in Routine Clinical Practice.

Evaluar la variabilidad interindividual en la concentración valle en plasma de los IP e ITINAN en la práctica clínica habitual.

Evaluar la proporción de los pacientes infectados por el VIH que reciben tratamiento antirretroviral en la práctica clínica que presentan concentraciones plasmáticas de IP e ITINAN inferiores a la concentración mínima eficaz.

Estudio 2: Lopinavir/Ritonavir Pharmacokinetics in HIV and Hepatitis C Virus Co-Infected Patients without Liver Function Impairment. Influence of Liver Fibrosis.

Evaluar la influencia de la co-infección por el virus de la hepatitis C en la exposición a lopinavir y ritonavir en los pacientes infectados por el VIH sin signos clínicos ni analíticos de insuficiencia hepática.

Evaluar la influencia del grado de fibrosis hepática asociada a la co-infección por el virus de la hepatitis C en los parámetros farmacocinéticos de lopinavir y ritonavir en los pacientes infectados por el VIH sin signos clínicos ni analíticos de insuficiencia hepática.

Estudio 3: Simultaneous Population Pharmacokinetic Model for Lopinavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults.

Desarrollar y validar un modelo farmacocinético poblacional simultáneo para lopinavir y ritonavir en una población de pacientes adultos infectados por el VIH en tratamiento con lopinavir/ritonavir, incorporando las características individuales de los pacientes que son responsables de la variabilidad cinética observada en la práctica clínica así como la interacción entre los dos fármacos.

PUBLICACIONES

ESTUDIO 1

Variability in Antiretroviral Agents Concentration in Plasma among HIV-Infected Adults in Routine Clinical Practice.

Br J Clin Pharmacol 2006;62:560-566

Autores: Moltó J, Blanco A, Miranda C, Miranda J, Puig J, Valle M, DelaVarga M, Fumaz CR, Barbanoj MJ, Clotet B.

ESTUDIO 2

Lopinavir/Ritonavir Pharmacokinetics in HIV and Hepatitis C Virus Co-Infected Patients without Liver Function Impairment. Influence of Liver Fibrosis.

Clin Pharmacokinet 2007;46:85-92

Autores: Moltó J, Valle M, Blanco A, Negro E, DelaVarga M, Miranda C, Miranda J, Domingo P, Vilaró J, Tural C, Costa J, Barbanoj MJ, Clotet B.

ESTUDIO 3

Simultaneous Population Pharmacokinetic Model for Lopinavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults.

Clinical Pharmacokinetics 2008; (en prensa).

Autores: Moltó J, Barbanoj MJ, Miranda C, Blanco A, Santos JR, Negro E, Costa J, Domingo P, Clotet B, Valle M.

ESTUDIO 1

Variability in Antiretroviral Agents Concentration in Plasma among HIV-Infected Adults in Routine Clinical Practice.

Reproducido de: **Br J Clin Pharmacol 2006;62:560-566**

Variability in non-nucleoside reverse transcriptase and protease inhibitor concentrations among HIV-infected adults in routine clinical practice

José Moltó,^{1,4} Asunción Blanco,² Cristina Miranda,¹ José Miranda,¹ Jordi Puig,¹ Marta Valle,^{3,4} Meritxell DelaVarga,² Carmina R. Fumaz,¹ Manuel José Barbanjo^{3,4} & Bonaventura Clotet^{1,2}

¹'Lluita contra la SIDA' Foundation and ²'IrsiCaixa' Foundation, Germans Trias i Pujol Hospital, Badalona, ³Centre d'Investigació de Medicaments, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and ⁴Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain

What is already known about this subject

- The concentration of protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in plasma has been related to both efficacy and toxicity.
- Most antiretroviral concentration data come from selected populations of patients undergoing therapeutic drug monitoring programmes, which may overestimate interindividual variability.

What this study adds

- Our study has demonstrated the large interindividual variability in antiretroviral drug concentrations in an unselected population of patients during routine clinical practice.
- These results may provide interesting information to clinicians for the management of antiretroviral therapy in HIV-infected patients.

Correspondence

José Moltó MD, Fundació Lluita contra la SIDA, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Ctra de Canyet, s/n. 08916 Badalona, Barcelona, Spain.

Tel: + 34 9 3497 8887

Fax: + 34 9 3465 7602

E-mail: jmolto@flsida.org

Keywords

antiretroviral agents, clinical practice, drug concentrations, HIV infection, interindividual variability

Received

6 March 2006

Accepted

22 March 2006

Aims

The objective of this study was to assess interindividual variability in trough concentrations of plasma of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) and protease inhibitors (PI) among HIV-infected adults in a routine outpatient setting.

Methods

One hundred and seventeen patients who attended our clinic for routine blood tests, and who were receiving antiretroviral therapy which included NNRTI or PI were studied. Patients were not informed that drug concentrations were going to be measured until blood sampling. The times of the last antiretroviral dose and of blood sampling were recorded. Drug concentrations were considered optimal if they were above the proposed minimum effective value. In addition, efavirenz, nevirapine and atazanavir concentrations were considered potentially toxic if they were $>4.0 \text{ mg l}^{-1}$, $>6.0 \text{ mg l}^{-1}$ and $>0.85 \text{ mg l}^{-1}$, respectively.

Results

Overall, interindividual variability of NNRTI and PI concentrations in plasma was approximately 50%, and only 68.4% of the patients had drug concentrations within the proposed therapeutic range. Poor adherence explained only 35% of subtherapeutic drug concentrations.

Conclusion

Interindividual variability in trough concentrations of NNRTI and PI among HIV-infected adults is large in routine clinical practice, with drug concentrations being outside the therapeutic window in a significant proportion of patients. These findings provide further evidence that therapeutic drug monitoring may be useful to guide antiretroviral therapy in clinical practice.

Introduction

Current highly active antiretroviral therapy (HAART) can successfully suppress HIV replication and its widespread use has resulted in a marked decrease in HIV-related morbidity and mortality [1]. However, despite the initial favourable response to HAART, it fails to maintain complete viral suppression in the long term in a significant proportion of HIV-infected subjects [2–4]. Treatment failure may be due to poor adherence on the part of the patients, the development of viral resistance, or to pharmacokinetic issues.

There is growing evidence of a relationship between non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) and protease inhibitors (PI) concentrations in plasma and the efficacy and toxicity of these drugs [5]. In this regard, small decreases in plasma concentrations of antiretroviral drugs can render them unable to maintain complete viral suppression, promoting treatment failure and evolution of viral resistance. On the other hand, excessively high drug concentrations may contribute, at least in part, to the appearance of antiretroviral therapy-related adverse events [6–18].

Marked differences in NNRTI and PI concentrations in plasma have been reported among HIV-infected subjects [5, 13, 15, 19, 20]. Moreover, a large proportion of patients had trough PI concentrations lower than the proposed minimum effective concentration (MEC) in previous studies [19–22]. This interindividual variability may be explained by differences in drug absorption, distribution, metabolism and elimination. In addition, poor adherence to treatment, concomitant disease and drug–drug or food–drug interactions may further enhance this variability.

Most of the currently available information regarding interindividual variability in the concentration of antiretroviral agents comes from clinical trials and therapeutic drug monitoring (TDM) units. However, results obtained in such settings may substantially differ from those observed in routine clinical practice with unselected patient populations. Thus, the objective of the present study was to assess the interindividual variability in trough NNRTI and PI concentrations in plasma among HIV-infected adults in a routine outpatient setting.

Patients and methods

HIV-infected subjects aged ≥ 18 years, who attended consecutively our clinic during a 2-week period for routine outpatient blood tests, were studied. To be eligible, patients had to be receiving an NNRTI- or a PI-based HAART for at least 4 weeks. Patients on treatment with more than one PI (ritonavir was not considered as a second PI when given at boosting doses) or with com-

binations of PI with NNRTI, were excluded. Informed consent was obtained from all patients at the time of blood sampling, and the protocol was approved by the ethics committee of our institution.

The primary end-point of the study was assess the interindividual variability in trough NNRTI and PI concentrations in plasma among HIV-infected adults. The relationship between drug concentrations and virological outcome or drug-related toxicity was also explored.

Demographic and clinical variables including age, sex, time since HIV diagnosis, hepatitis C virus coinfection, concomitant medication, treatment adherence, HIV-1 RNA load evolution and drug-related toxicity were recorded for each subject. Treatment adherence was self-reported as the number of doses taken out of those prescribed within the week before the sample collection. Viral load was recorded at the time of sampling and every 12 weeks thereafter up to 48 weeks of follow-up. Virological failure was defined as the presence of an HIV-1 RNA load >50 copies ml^{-1} in two consecutive determinations after at least 24 weeks on HAART or if previously undetectable. Specific drug-related toxicities were recorded in those patients on treatment with drugs for which an upper limit of the therapeutic window has been proposed. Thus, hypersensitivity reactions or liver enzyme elevations were registered in patients taking nevirapine, central nervous system disorders in those taking efavirenz, or total bilirubin or jaundice in those patients receiving atazanavir.

In an attempt to avoid modifying their normal adherence to antiretroviral therapy, subjects were not informed that drug concentrations were going to be measured until blood sampling. The time of the last dose of antiretroviral treatment and that of blood sampling were recorded for each patient. Because trough concentrations have been proposed as the most suitable pharmacokinetic parameter for routine clinical monitoring [5], only blood samples collected between 10 and 13 h or between 21 and 25 h after the last treatment intake were used in patients taking antiretroviral drugs twice or once daily, respectively. In the case of patients taking efavirenz once daily at bedtime, samples were collected during the day, at least 8 h after the last dose [15].

Blood samples were collected into potassium and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-containing tubes. Plasma was isolated by centrifugation (1200 g for 15 min) and stored at -20°C until analysis. Drug concentrations were determined by using a high-performance liquid chromatograph with a PDA detector (2996 Waters, Barcelona, Spain). Concentrations of nevirapine were measured using a NovaPak[®] C18 3.9 \times 150 mm analytical column and a NovaPak[®] C18 guard

column (Waters). The method involved precipitation of proteins with perchloric acid and injecting the supernatant by isocratic elution with phosphate buffer acetonitrile containing 0.1% of triethylamine (pH 6). The method was linear over a concentration range of 0.1–10 mg l⁻¹. Efavirenz concentrations were determined using solid-phase extraction, according to the method described by Sarasa-Nacenta *et al.* [23]. The analytical column was a NovaPak[®] C8, 4.6 × 150 mm and the guard column was a NovaPak[®] C8 (Waters). The method was validated over the range of 0.1–10 mg l⁻¹. Concentrations of lopinavir, nelfinavir, saquinavir, amprenavir, atazanavir and indinavir were quantified simultaneously. The analytical column used was a NovaPak[®] C18 3.9 × 150 mm and the guard column was a NovaPak[®] C18 (Waters). The method involved liquid–liquid extraction of the six drugs from plasma with tert-butyl methyl ether after basification and a second wash with hexane. Gradient elution using a mobile phase of phosphate buffer acetonitrile (pH 6.70) was performed. The method was linear over the range of 0.05–20 mg l⁻¹ for lopinavir, amprenavir, 0.042–17 mg l⁻¹ for nelfinavir, 0.044–17.5 mg l⁻¹ for saquinavir and atazanavir and 0.04–16 mg l⁻¹ for indinavir. The intraday and interday coefficients of variation of each method were lower than 8.2% and 8.7%, respectively. Our laboratory is subjected to the KKG T quality assurance programme organized by the Dutch Association for Quality Assessment in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology of the Radboud University Medical Centre Nijmegen, with 36 laboratories being involved in 2004 [24]. Plasma HIV-1 RNA was quantified by the Amplicor[®] Ultrasensitive Assay (Roche Amplicor HIV-1 Monitor assay, v1.5), with a limit of detection of 50 copies ml⁻¹.

Based on previously published data [18, 25], drug concentrations were considered optimal if they were above the proposed MEC. Thus, target trough concentrations were 3.4 mg l⁻¹ for nevirapine, 1.0 mg l⁻¹ for efavirenz, 0.8 mg l⁻¹ for nelfinavir, 0.1 mg l⁻¹ for indinavir and for saquinavir, 0.15 mg l⁻¹ for atazanavir, 1.0 mg l⁻¹ for lopinavir (4.0 mg l⁻¹ in patients who previously failed on PI therapies) and 0.4 mg l⁻¹ for amprenavir (1.2 mg l⁻¹ in patients who previously failed on PI therapies). In addition, efavirenz, nevirapine and atazanavir concentrations were considered potentially toxic if they were higher than 4.0 mg l⁻¹, 6.0 mg l⁻¹ and 0.85 mg l⁻¹, respectively [18, 25, 26].

Statistical analysis was performed using SPSS Version 11.5 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data with a normal distribution were presented as means (SD), whereas medians [interquartile range (IQR)] were presented for variables not normally distributed.

Interindividual variability in drug concentrations was assessed only for those agents administered to at least five patients. The coefficient of variation (CV) was calculated as the quotient of the SD divided by the mean. Proportions were compared by the χ^2 or the Fisher's exact test, where appropriate.

Results

One hundred and ninety-one patients receiving NNRTI or PI therapy attended our clinic for routine blood tests. Of these, 117 patients were eligible for the study and were included. Median (IQR) length of time on the current antiretroviral regimen was 20 (8.5–39) months. Overall, compliance with antiretroviral therapy was high and 82% of the patients stated that they had taken all the prescribed doses within the previous week. Table 1 summarizes the demographic and clinical characteristics.

Sixty patients were receiving one NNRTI and 57 subjects one PI when blood samples were collected (Table 1). Forty-two patients were receiving efavirenz (600 mg once daily) and 18 were using nevirapine (200 mg twice daily). Forty-three subjects were taking lopinavir/ritonavir (400/100 mg twice daily), nelfinavir (1250 mg twice daily) was being used by seven patients, saquinavir/ritonavir (1000/100 mg twice daily) by one, amprenavir/ritonavir (600/100 mg twice daily) by two,

Table 1

Demographic and clinical characteristics of the 117 patients studied

	<i>n</i> (%)
Gender	
Male	79 (67.5)
Female	38 (32.5)
Age (years)*	41.1 (9.4)
HCV	50 (42.7)
Years since HIV diagnosis*	10.5 (5.2)
Months on ARV therapy†	20.0 (8.5–39.0)
Current ARV treatment	
NNRTI	60 (51.3)
PI	57 (48.7)
Missing doses within the previous week	
0	96 (82.1)
1	16 (13.7)
≥ 2	5 (4.2)

Data are expressed as *n* (%), except where noted. HCV, Hepatitis C virus; ARV, antiretroviral; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor. *Mean (SD). †Median (interquartile range).

atazanavir (400 mg once daily) by three and indinavir (1200 mg twice daily) by one patient. No one was receiving ritonavir as single PI when samples were collected.

The mean (SD) sampling time was 11.3 (0.8) h after the last dose for subjects on a twice-daily antiretroviral regimen ($n = 72$), 22.0 (1.1) h for patients on a once-daily regimen at breakfast time ($n = 3$) and 10.2 (1.1) h for patients receiving efavirenz once daily at bed-time ($n = 42$).

The plasma concentration data are presented in Figure 1. One sample, taken from a patient receiving lopinavir, was below the lower limit of quantification. Overall, interindividual variability in plasma NNRTI and PI concentrations was approximately 50%. In addition, 12% of the patients showed drug concentrations below the MEC, with only 68% of NNRTI or PI concentrations being within the proposed therapeutic range (Table 2).

When drug class was considered, drug concentrations were optimal in only 52% of the patients treated with NNRTIs, compared with 86% receiving PIs (odds ratio 0.17; 95% confidence interval 0.06, 0.46; $P < 0.001$). Out of the 18 patients on nevirapine therapy, drug concentrations were subtherapeutic in five (28%), potentially toxic in eight (44%) and optimal in only five subjects (28%). Similarly, efavirenz concentrations were within the therapeutic range in 62% of the patients who were receiving this drug. Although only one patient on efavirenz therapy had drug concentrations $< 1.0 \text{ mg l}^{-1}$, concentrations were found to be potentially toxic in 15 (36%) of the patients being treated with this drug. The proportion of patients with PI concentrations above the proposed MEC was approximately 80% in those receiving lopinavir/ritonavir and 100% in those using nelfinavir, saquinavir, amprenavir, atazanavir or indinavir (Table 2).

Out of the 14 patients achieving NNRTI or PI plasma concentrations below the MEC, nonadherence was found to be a possible explanation for five cases (36%). The reason that the remainder of this group had subtherapeutic drug concentrations is unknown.

Overall, 17 patients developed virological failure during the 48-week period which followed blood sampling. Drug concentrations were above the proposed MEC in 16 patients and only one subject had subtherapeutic drug concentrations ($P = 0.69$). No patient receiving nevirapine or atazanavir therapy developed significant drug-related toxicity during the follow-up. On the other hand, nine out of the 42 patients who were receiving efavirenz experienced central nervous system disturbances. However, concentrations of this drug in plasma were consid-

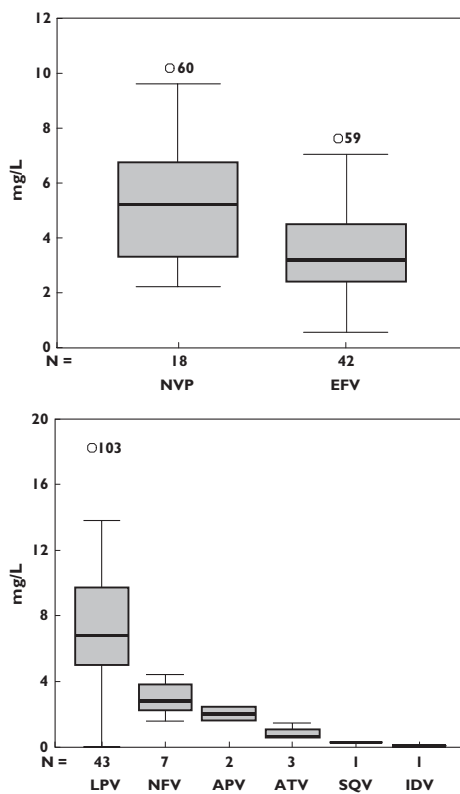


Figure 1

Trough plasma concentrations of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and protease inhibitor. The box plot provides a five-point summary of the data: minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum. NVP, Nevirapine; EFV, efavirenz; LPV, lopinavir; NFV, nelfinavir; APV, amprenavir; ATV, atazanavir; SQV, saquinavir; IDV, indinavir

ered optimal in most of the patients and only two (22%) had concentrations $> 4.0 \text{ mg l}^{-1}$. Similarly, the proportion of subjects who developed central nervous system symptoms while receiving efavirenz was similar in patients with drug concentrations above and below 4.0 mg l^{-1} ($P = 0.451$).

Discussion

Our results show that plasma concentrations of NNRTI and PI may vary widely among HIV-infected adults in a routine outpatient setting. In addition, drug concentra-

Table 2

Distribution of the plasma concentrations of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors

Antiretroviral drug	Number	Concentration (mg l ⁻¹)*	CV (%)	Optimal n (%)
Nevirapine	18	5.31 (2.13)	40.1	5 (27.8)
Efavirenz	442	3.62 (1.70)	46.9	26 (61.9)
Lopinavir	43	7.26 (3.91)	53.8	35 (81.4)
Nelfinavir	7	3.02 (1.11)	36.7	7 (100)
Saquinavir/rtv	1	0.350		1 (100)
Amprenavir/rtv	2	2.06 (1.66–2.45)†		2 (100)
Atazanavir	3	0.67 (0.62–1.52)†		3 (100)
Indinavir	1	0.10		1 (100)
Total	117			80 (68.4)

CV, Coefficient of variation; rtv, ritonavir. *Data are expressed as mean (SD), except where noted. †Median (interquartile range).

tions were outside the recommended therapeutic window in almost one-third of our patients.

Overall, our results are concordant with previously reported data. In a study performed by de Maat *et al.* of 97 subjects, drug concentrations were subtherapeutic in one-quarter of the 1145 samples analysed [20]. The lower prevalence of subtherapeutic drug concentrations observed in our study is probably because the drug analyses in the study by de Maat *et al.* were all requested for TDM purposes and samples were not collected in a systematic way. In addition, many patients in that study had repeated drug determinations over time. As a consequence, the inclusion of patients whose drug concentrations were suspected to be outside the therapeutic range might have been favoured, leading to an overestimation of the true prevalence of subtherapeutic drug concentrations. The present study included all subjects on NNRTI or PI therapy attending our clinic over a representative period of time and only one sample was collected from each patient. Thus, our results may represent more accurately the actual prevalence of drug concentrations outside the therapeutic window among HIV-infected adults in routine clinical practice.

Variability in drug concentrations may have important consequences for antiretroviral therapy. Subtherapeutic drug concentrations may prevent sustained viral suppression in HIV-infected patients and may predispose them to the development of viral resistance, limiting future re-utilization of antiretroviral agents [27]. On the other hand, inappropriately high drug concentrations are associated with adverse events, which may have a negative effect on quality of life and treatment adherence [18, 25, 26]. In our study, interindividual variability in drug concentrations in subjects receiving the same dose

of each NNRTI or PI was about 50%. Fourteen out of the 117 patients studied showed drug concentrations below the proposed MEC and one-third of the patients receiving NNRTI therapy had potentially toxic drug concentrations. In addition, inappropriate adherence explained less than half of the subtherapeutic drug concentrations. This finding suggests that individual differences in drug absorption, distribution, metabolism or elimination may be responsible for variability in drug concentrations and that, although other factors such as intraindividual variability should also be considered [5], monitoring drug concentrations of antiretroviral agents might be of help in clinical practice.

We found no relationship between drug exposure and the development of virological failure or drug-related toxicity in this study. Thus, the proportion of patients who developed virological failure was similar between patients with drug concentrations below and above the proposed MEC. Our results are in disagreement with previous observations [11–19] and may suggest that the role of TDM is limited. However, several points should be considered when interpreting these findings. First, the main objective of this study was to assess interindividual variability in drug concentrations in clinical practice and only few patients developed treatment failure or drug-related toxicity during follow-up. As a consequence, the study may not have been powerful enough to relate clinical outcome to drug exposure. In addition, we measured drug concentrations at only a single time point, which may not have been representative of values throughout follow-up. Finally, the clinical usefulness of the limits of the therapeutic window proposed for some antiretroviral agents continues being debated. In this regard, although Marzolini *et al.* identified efavirenz

concentrations $>4.0 \text{ mg l}^{-1}$ as being associated with central nervous system disorders [15], Kappelhoff *et al.* found no relationship between efavirenz exposure and the development of neuropsychiatric disturbances [28]. In addition, the target MEC may vary widely between individuals, or even within the same subject with time, due to the accumulation of drug resistance mutations in the viral genome and to the gradual decrease in drug susceptibility.

In conclusion, wide interindividual variability in plasma concentrations of PI and NNRTI among HIV-infected adults in routine clinical practice was observed, with drug concentrations being outside the proposed therapeutic window in a significant proportion of patients. These results, in combination with the lower intraindividual variability in PI and NNRTI concentrations previously reported [15, 29], support a potential role for TDM of antiretroviral therapy. Prospective, randomized, appropriately powered trials assessing the clinical usefulness of this strategy are needed.

J.M. is supported by FIS trough grant 030135 from the Fundació per a la Recerca Biomèdica Germans Trias i Pujol in collaboration with the Spanish Health Department. M.V. is supported by FIS trough grant CP04/00121 from the Spanish Health Department in collaboration with Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

References

- Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998; 238: 853–60.
- Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ Jr, Feinberg JE, Balfour HH Jr, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA. A controlled trial of two nucleoside analogues plus didanosine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimetre or less. *N Engl J Med* 1997; 337: 725–33.
- Deeks SG, Hecht FM, Swanson M, Elbeik T, Loftus R, Cohen PT, Grant RM. HIV RNA and CD4 cell count response to protease inhibitor therapy in an urban AIDS clinic: response to both initial and salvage therapy. *AIDS* 1999; 13: F35–F43.
- Barlett JA, DeMasi R, Quinn J, Moxham C, Rousseau F. Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-1 infected adults. *AIDS* 2001; 15: 1369–77.
- Back D, Gatti G, Fletcher C, Garraffo R, Haubrich R, Hoetelmans R, Kurowski M, Lubner A, Merry C, Perno CF. Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions. *AIDS* 2002; 16 (Suppl. 1): S5–S37.
- Murphy R. Antiretroviral therapy in patients with suboptimal virologic suppression. *AIDS Rev* 1999; 1: 205–12.
- Drusano GL, Biello JA, Stein DS, Nessly M, Meibohm A, Emini EA, Deusch P, Condra J, Chodakewitz J, Holder DJ. Factors influencing the emergence of resistance to didanosine: role of virologic, immunologic, and pharmacologic variables. *J Infect Dis* 1998; 78: 360–7.
- Reijers MH, Weigel HM, Hart AA, Ten Kate RW, Mulder JW, Reiss P, Schuitemaker H, Hoetelmans RM, Weverling GJ, Lange JM. Toxicity and drug exposure in a quadruple drug regimen in HIV-1 infected patients participating in the ADAM study. *AIDS* 2000; 14: 59–67.
- Burger DM, Hoetelmans RM, Hugen PW, Mulder JW, Meenhorst PL, Koopmans PP, Brinkman K, Keuter M, Dolmans W, Hekster YA. Low plasma concentrations of didanosine are related to virological treatment failure in HIV-1 infected patients on didanosine-containing triple therapy. *Antivir Ther* 1998; 3: 215–20.
- Dieleman JP, Gyssens IC, van der Ende ME, de Marie S, Burger DM. Urological complaints in relation to didanosine plasma concentrations in HIV-infected patients. *AIDS* 1999; 13: 473–8.
- Gieschke R, Fotteler B, Buss N, Steiner JL. Relationship between exposure to zidovudine monotherapy and antiviral response in HIV-positive patients. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 75–86.
- Burger D, Hugen PW, Aarnoutse RE, Hoetelmans R, Jambroes M, Nieuwerkerk PT, Schreijf G, Schneider MM, van der Ende ME, Lange JM, ATHENA Study Group. Treatment failure of zidovudine-containing triple therapy can largely be explained by low zidovudine plasma concentrations. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 73–80.
- Sadler BM, Guillotin C, Lou Y, Stein DS. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the human immunodeficiency virus protease inhibitor didanosine after multiple oral dosing. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 30–7.
- Masquelier B, Breilh D, Neau D, Lawson-Ayayi S, Lavignolle V, Ragnaud JM, Dupon M, Morlat P, Dabis F, Fleury H. Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to zidovudine-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2926–32.
- Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1 infected patients. *AIDS* 2001; 15: 71–5.
- Veldkamp AL, Weverling GJ, Lange JM, Montaner JS, Reiss P, Cooper DA, Vella S, Hall D, Beijnen JH, Hoetelmans RM. High exposure to nevirapine in plasma is associated with an improved virological response in HIV-1 infected individuals. *AIDS* 2001; 15: 1089–95.
- Havir D, Cheeseman SH, McLaughlin M, Murphy R, Erice A, Spector SA, Greenough TC, Sullivan JL, Hall D, Myers M. High-dose nevirapine: safety, pharmacokinetics, and antiviral effect in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1995; 171: 537–45.

- 18 Gonzalez de Requena D, Bonora S, Canta F, Marrone R, D'Avolio A, Sciadra M, Milia M, Di Garbo A, Sinicco A, Di Perri G. Atazanavir C trough is Associated with Efficacy and Safety: Definition of Therapeutic Range. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston February 2005 [Abstract 645].
- 19 Torti C, Quiros-Roldan E, Tirelli V, Regazzi-Bonora M, Moretti F, Pierotti P, Orani A, Maggi P, Cargnel A, Patroni A, De Luca A, Carosi G. Lopinavir plasma levels in salvage regimens by a population of highly active antiretroviral therapy-treated HIV-1-positive patients. *AIDS Patient Care Stds* 2004; 18: 629–34.
- 20 de Maat MM, Huitema AD, Mulder JW, Meenhorst PL, van Gorp ECM, Mairuhu ATA, Beijnen JH. Subtherapeutic antiretroviral concentrations in routine clinical outpatient HIV care. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 367–73.
- 21 Langmann P, Zilly M, Weissbrich B, Schlor C, Vath T, Richter E, Klinker H. Therapeutic drug monitoring of saquinavir in patients during protease inhibitor therapy with saquinavir alone or in combination with ritonavir or nelfinavir. *Eur J Med Res* 2000; 5: 59–62.
- 22 Burger D, Huguen P, Reiss P, Gyssens I, Schneider M, Kroon F, Schreij G, Brinkman K, Richter C, Prins J, Aaranoutse R, Lange J, ATHENA Study Group. Therapeutic drug monitoring of nelfinavir and indinavir in treatment-naïve HIV-infected individuals. *AIDS* 2003; 17: 1157–65.
- 23 Sarasa-Nacenta M, López-Púa Y, López-Cortés LF, Mallolas J, Gatell JM, Carne X. Determination of efavirenz in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromat B Biomed Sci Appl* 2001; 763: 53–9.
- 24 Droste JAH, Aarnoutse RE, Koopmans PP, Hekster YA, Burger DM. Evaluation of antiretroviral drug measurements by an interlaboratory quality control program. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32: 287–91.
- 25 Back DJ, Blashke TF, Boucher C, Burguer D, Fletcher C, Flexner C, Gerber J, Shapiro J. Optimising TDM in HIV Clinical Care: a Practical Guide to Performing Therapeutic Drug Monitoring (TDM) for Antiretroviral Agents [online]. Available from URL <http://www.hivpharmacology.com> Last accessed 10 January 2005.
- 26 de Maat MM, ter Heine R, Mulder JW, Meenhorst PL, Mairuhu ATA, van Gorp ECM, Huitema AD, Beijnen JH. Incidence and risk factors for nevirapine-associated rash. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 457–62.
- 27 Harrigan PR, Hogg RS, Dong WW, Yip B, Wynhoven B, Woodward J, Brumme CJ, Brumme ZL, Mo T, Alexander CS, Montaner JS. Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large antiretroviral-naïve cohort initiating antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2005; 191: 339–47.
- 28 Kapelhoff BS, van Leth F, Robinson PA, MacGrigor TR, Baraldi E, Montella F, Uip DE, Thompson MA, Russell DB, Lange JM, Beijnen JH, Huitema AD. Are adverse events of nevirapine and efavirenz related to plasma concentrations? *Antivir Ther* 2005; 10: 489–98.
- 29 Marzolini C, Buclin T, Decosterd LA, Biollaz J, Telenti A. Nelfinavir plasma levels under twice-daily and three-times-daily regimens: high interpatient variability and low inpatient variability. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 394–8.

ESTUDIO 2

Lopinavir/Ritonavir Pharmacokinetics in HIV and Hepatitis C Virus Co-Infected Patients without Liver Function Impairment. Influence of Liver Fibrosis.

Reproducido de: **Clin Pharmacokinet 2007;46:85-92**

Lopinavir/Ritonavir Pharmacokinetics in HIV and Hepatitis C Virus Co-Infected Patients without Liver Function Impairment

Influence of Liver Fibrosis

José Moltó,^{1,2} Marta Valle,^{2,3} Asunción Blanco,⁴ Eugenia Negrodo,¹ Meritxell DelaVarga,⁴ Cristina Miranda,¹ José Miranda,¹ Pere Domingo,⁵ Josep Vilaró,⁶ Cristina Tural,¹ Joan Costa,⁷ Manuel José Barbano,^{2,3} and Bonaventura Clotet^{1,2,4}

- 1 Fundació "Lluita contra la SIDA", Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
- 2 Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- 3 Centre d'Investigació de Medicaments, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain
- 4 Fundació "IrsiCaixa", Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
- 5 Department of Internal Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain
- 6 Department of Internal Medicine, Hospital de Vic, Vic, Spain
- 7 Department of Clinical Pharmacology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Abstract

Background and objective: To assess the influence of hepatitis C virus (HCV) co-infection and the extent of liver fibrosis on lopinavir/ritonavir pharmacokinetics in HIV-infected patients without liver function impairment.

Methods: Cross-sectional, comparative study enrolling HIV-infected adults receiving lopinavir/ritonavir (400mg/100mg twice daily). HIV/HCV co-infected patients were grouped as having advanced fibrosis (HCV+/FIB+, n = 7) or not (HCV+/FIB-, n = 8) based on the FIB-4 index. A full concentration-time profile was obtained for each patient, and blood samples were collected before (0), and 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours after a lopinavir/ritonavir dose. Lopinavir and ritonavir concentrations in plasma were determined by high-performance liquid chromatography. Maximum and minimum plasma concentrations (C_{max} and C_{min}), area under the plasma concentration-time curve from 0 to 12 hours (AUC_{12}), apparent oral clearance at steady state (CL_{ss}/F), and apparent volume of distribution after oral administration (V_d/F) were calculated for each individual using a non-compartmental approach.

Results: Twenty-six HCV- and 22 HCV+ patients were enrolled. Lopinavir and ritonavir pharmacokinetics were comparable between HCV- and HCV+ patients. However, the V_d/F of lopinavir was 125% higher in HCV+/FIB+ patients than in HCV- patients ($p = 0.015$) and 107% higher than in HCV+/FIB- ($p = 0.040$) patients. The CL_{ss}/F of ritonavir was 40% lower in HCV+/FIB+ patients than in HCV- patients ($p = 0.005$) and 44% lower than in HCV+/FIB- patients ($p = 0.040$). Thus, for ritonavir AUC_{12} , C_{max} and C_{min} in HCV+/FIB+ patients were

63%, 86% and 100% higher, respectively, when compared with those parameters in HCV- patients ($p = 0.005$, $p = 0.012$ and $p = 0.015$, respectively), and 80%, 86% and 100% higher, respectively, when compared with levels in HCV+/FIB- patients ($p = 0.040$, $p = 0.040$ and $p = 0.029$, respectively).

Conclusion: Lopinavir exposure is similar in HIV-infected patients with or without HCV co-infection and without liver function impairment. However, ritonavir exposure may be higher in this setting, particularly in individuals with advanced liver fibrosis.

Background and Objective

Following the decline in HIV-related morbidity and mortality that followed the widespread use of highly active antiretroviral therapies (HAARTs), end-stage liver disease has recently emerged as a major health problem in HIV-infected patients. Up to 50% of deaths among people with HIV infection are currently attributed to liver disease, which is mostly due to hepatitis C virus (HCV) co-infection.^[1-4]

HCV and HIV co-infection is common, occurring in 50–80% of individuals who acquired HIV through parenteral exposure.^[5,6] In addition, the natural history of HCV infection in HIV/HCV co-infected patients differs from that of the general population, and progression to liver cirrhosis and liver function impairment has been reported to be faster in co-infected subjects.^[7] Moreover, the risk of developing liver toxicity in patients undergoing HAART is higher among HIV/HCV co-infected subjects than in HCV-free subjects.^[8-13]

Several mechanisms may be involved in drug-related liver-toxicity among HIV/HCV co-infected patients receiving HAART. It is well known that many of the drugs used to treat HIV infection are widely metabolised by the liver. As a result, changes induced by chronic viral infections in the metabolic pathways involved in drug clearance could lead to increased concentrations of antiretrovirals in plasma.^[14-17] Interestingly, Aranzabal et al.^[18] reported a relationship between the risk of developing liver toxicity and the stage of liver fibrosis in HIV/HCV co-infected patients starting HAART. However, the relationship between the extent of liver fibrosis and the exposure to antiretroviral agents was not further explored in that study.

Lopinavir and ritonavir are two HIV protease inhibitors which are both extensively metabolised by the hepatic cytochrome P450 (CYP), particularly by the isoenzyme CYP3A4.^[19,20] In addition, ritonavir is a potent inhibitor of the CYP system, and a co-formulation of lopinavir with low doses of ritonavir increases lopinavir concentrations in plasma to several times the minimum concentration required to suppress replication of wild-type strains of HIV. Previous studies have shown that the risk of developing liver enzyme elevations during antiretroviral therapy with lopinavir/ritonavir was 5- to 12-fold higher in HIV/HCV co-infected individuals than in those infected with HIV alone.^[11,12,21] Moreover, in a pilot study, exposure to both lopinavir and ritonavir was significantly increased in co-infected patients with mild to moderate hepatic impairment in comparison with control patients with normal liver function.^[17] However, hepatic impairment is absent in the majority of HIV/HCV co-infected patients. Thus, the question that remains is whether any special consideration regarding lopinavir/ritonavir exposure is necessary for HIV/HCV co-infected patients without evidence of liver function impairment.

The objective of the present study was to assess the influence of HCV co-infection on exposure to lopinavir/ritonavir in HIV-infected subjects without clinical or analytical evidence of hepatic insufficiency. Furthermore, the relationship between lopinavir/ritonavir pharmacokinetic parameters and the extent of HCV-associated liver fibrosis was explored.

Patients and Methods

Patients included in this cross-sectional, comparative study were HIV-infected subjects aged 18 years or older who were receiving stable antiretroviral therapy with oral lopinavir/ritonavir (Kale-

tra®; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)¹ at the standard dosage of 400mg/100mg twice daily for at least 4 weeks. The Child Pugh score was used to assess hepatic insufficiency,^[22] and patients with scores above 5 were excluded. Other exclusion criteria were self-reported treatment adherence lower than 90% within the previous 2 weeks, prior or current therapy with interferon or ribavirin, active alcohol (ethanol) consumption (>50 g/day), and concomitant administration of other drugs known to affect lopinavir/ritonavir pharmacokinetics.^[19] The ethics committee of Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain, approved the study and all subjects gave their written consent before enrollment.

Demographic and clinical variables, including age, sex, bodyweight, time since HIV infection diagnosis, HCV antibodies and concomitant medications, including over-the-counter medications, were recorded for each participating patient. In addition, a complete blood cell count, prothrombin time and analysis of blood chemistry (including creatinine, total protein, albumin, total bilirubin, AST, ALT, γ -glutamyl transferase and alkaline phosphatase) were determined.

In order to assess the influence of liver damage on exposure to lopinavir/ritonavir, the FIB-4 index was used in co-infected patients to estimate the extent of liver fibrosis. This index was calculated by (equation 1):

$$\text{FIB-4} = \frac{\text{Age} \times \text{AST}}{\text{Platelets} \times \sqrt{\text{ALT}}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where age is expressed in years, AST and ALT concentrations in U/L, and platelet count as cells $\times 10^9/\text{L}$.

Based on their FIB-4 score, HCV-positive patients were grouped into three different categories. Patients with a FIB-4 score ≤ 1.45 were regarded as not having advanced liver fibrosis (HCV+/FIB-, $n = 8$) whereas subjects with a FIB-4 score ≥ 3.25 were classified as having advanced liver fibrosis (HCV+/FIB+, $n = 7$). Since FIB-4 scores ranging from 1.45 to 3.25 are less predictive of the extent of liver

fibrosis,^[23] patients having these values ($n = 7$) were excluded from the data analysis for the purpose of assessing the influence of liver damage on exposure to lopinavir/ritonavir.

A full concentration-time profile was obtained for each participating patient, and blood samples were collected immediately before (0), and 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours after a witnessed lopinavir/ritonavir morning dose. Following the manufacturer's recommendations, lopinavir/ritonavir was given with a standard meal consisting of 300 kcal.^[19] Patients were asked to record the time they had last taken a lopinavir/ritonavir dose on the day before the visit. In addition, the exact times of the lopinavir/ritonavir dose and blood sampling during the visit were recorded.

Blood samples for determination of lopinavir and ritonavir plasma concentrations were collected in potassium and EDTA-containing 10mL tubes. Plasma was isolated by centrifugation (4000 rpm for 15 minutes), and stored at -20°C until analysis. Lopinavir and ritonavir concentrations in plasma were simultaneously determined by high-performance liquid chromatography with a photo diode array detector (HPLC-PDA 2996, Waters Corporation, Barcelona, Spain), according to a validated method. The analytical column was a NovaPak C18 $3.9 \times 150\text{mm}$ with a guard column of NovaPak C18 (Waters Corporation). The method involved liquid-liquid extraction of the two drugs from plasma with tert-butyl methyl ether after basification and a second wash with hexane. The mobile phase consisted of a gradient elution with phosphate buffer acetonitrile (pH 6.7). The method was linear over the range of 0.05 to 20 mg/L for both drugs. The inter- and intra-day coefficients of variation were 2.45–7.14% and 2.7–4.3% for lopinavir, and 2.94–3.55% and 3.38–4.53% for ritonavir, respectively. Our laboratory is subject to the Kwaliteitsbewaking Klinische Geneesmiddelenanalyse en Toxicologie (KKG) quality assurance programme organised by the Dutch Association for Quality Assessment in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology of the Radboud University Medical Centre in Nijmegen, The Netherlands.^[24]

1 The use of trade names is for product identification purposes only and does not imply endorsement.

Table I. Demographic characteristics of the enrolled patients^a

Characteristic	HCV- (n = 26)	HCV+ (n = 22)		p-Value ^b	
	(A)	(B) all (n = 22)	(C) FIB- (n = 8)		(D) FIB+ (n = 7)
Age (years)	44.5 (9.7)	42.9 (7.6)	40.2 (5.5)	42.6 (5.3)	NS
Bodyweight (kg)	79.4 (10.3)	68.4 (7.9)	68.3 (9.6)	74.8 (13.6)	NS
AST (U/L)	21.5 (19.7–29.7) ^c	49.0 (31.0–62.0) ^c	36.0 (31.0–48.0) ^c	62.0 (56.0–124.0) ^c	<0.001 for all comparisons
ALT (U/L)	22.0 (15.7–27.2) ^c	48.0 (29.0–92.0) ^c	49.5 (25.5–83.5) ^c	73.0 (47.0–100.0) ^c	<0.001 for all comparisons
Protein (mg/dL)	7.26 (0.41)	7.58 (0.66)	7.3 (7.1–7.8) ^c	7.4 (7.2–8.2) ^c	NS
Albumin (mg/dL)	4.39 (0.36)	4.21 (0.46)	4.2 (4.2–4.5) ^c	4.1 (3.7–4.4) ^c	0.040 A vs D

a Data are expressed as mean (SD) unless specified otherwise.

b Comparisons were made with the Mann-Whitney nonparametric test.

c Median (interquartile range).

HCV = hepatitis C virus; NS = not significant.

Pharmacokinetic Analysis

The following pharmacokinetic parameters were calculated for each individual using a non-compartmental approach by means of WinNonlin software (Version 2.0; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA): maximum plasma concentration (C_{max}), minimum plasma concentration between 0 and 12 hours (C_{min}) and area under the plasma concentration-time curve during the dose interval (AUC_{12}), which was calculated by means of the linear trapezoidal rule. Apparent oral clearance at steady state (CL_{ss}/F) was determined as dose/ AUC_{12} and apparent volume of distribution after oral administration (V_d/F) was calculated as dose/ $\lambda_z \times AUC_{12}$. The terminal elimination rate constant, λ_z ,

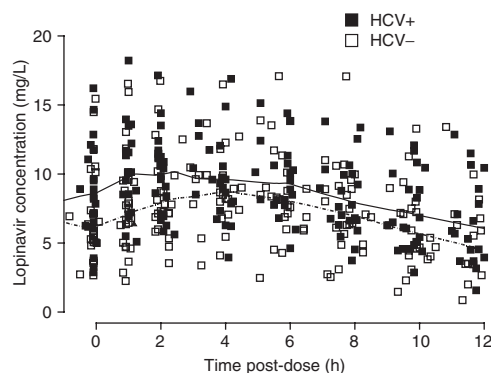


Fig. 1. Observed lopinavir plasma concentrations in hepatitis C virus (HCV)+ and HCV- patients. The continuous line represents the smooth function of the data for HCV+ patients; the dashed line represents the smooth function of the data for HCV- patients. Observations before and up to timepoint 0 hours represent data from samples obtained before drug administration.

was obtained by linear regression analysis of the terminal log-linear portion of the plasma concentration-time curve.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using SPSS Version 11.5 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Lopinavir and ritonavir pharmacokinetic parameters were compared between HCV+ and HCV- patients. In addition, multiple comparisons between HCV-, HCV+/FIB- and HCV+/FIB+ patients were performed. Pharmacokinetic parameter distribution was explored by the Kolmogorov-Smirnov test, and as the data did not follow a normal distribution, comparisons were made using the Mann-Whitney non parametric test. The relationship between continuous variables and drug exposure was assessed by a linear regression model. In order to account for the potential influence of sex or bodyweight on drug exposure, multiple regression models including these variables were tested.

The sample size in each study group to detect a minimum difference of 25% in the AUC_{12} for lopinavir between HCV+ and HCV- subjects was 22, when accepting an α risk of 0.05 and a β risk of 0.20.

Results

A total of 26 HCV- and 22 HCV+ patients were enrolled in the study. Table I summarises the main demographic and clinical characteristics of the patients by their HCV status and FIB-4 index. There were 35 males and 13 females (9 in the HCV- and 4

in the HCV+ group, $p = 0.206$). Overall, patients had been diagnosed with HIV infection for a median (interquartile range [IQR]) of 12 (5–15) years, and they had been on lopinavir/ritonavir therapy for a median of 73 (25–95) weeks before the pharmacokinetic assessments. Although HCV- and HCV+ patients were comparable regarding age, bodyweight and total protein or albumin concentrations in plasma, AST and ALT concentrations were higher among HCV+ subjects (table I).

Lopinavir Pharmacokinetics

Observed lopinavir concentrations are represented in figure 1. Overall, lopinavir concentrations were higher in HCV+ than in HCV- patients throughout the dose interval. The median lopinavir AUC_{12} was 99.3 (76.4–125.6) mg • h/L in HCV+ subjects and 83.4 (73.4–103.8) mg • h/L in HCV- patients (table II). However, this difference was not large enough to be statistically significant ($p = 0.147$). Similarly, there were no significant differences between HCV+ and HCV- patients regarding the C_{max} , C_{min} , V_d/F and CL_{ss}/F for lopinavir (table II). The lopinavir AUC_{12} was unrelated to demographic characteristics, AST ($p = 0.900$) or ALT ($p = 0.789$) concentrations in plasma.

When the FIB-4 index was considered, the lopinavir V_d/F of lopinavir was 125% greater in HCV+/FIB+ patients than in HCV- patients and 107% greater than in HCV+/FIB- individuals (table II). On the other hand, differences in the lopinavir AUC_{12} , C_{max} , C_{min} or CL_{ss}/F were not significant

between HCV-, HCV+/FIB- and HCV+/FIB+ patients.

Ritonavir Pharmacokinetics

Overall, although HCV+ patients showed higher ritonavir concentrations than HCV- patients during the dose interval (figure 2), ritonavir AUC_{12} and CL_{ss}/F were not significantly different between the two groups (table III). However, when the FIB-4 index was also considered, the CL_{ss}/F of ritonavir in HCV+/FIB+ patients was 40% lower than in HCV- patients and 44% lower than in HCV+/FIB- patients ($p < 0.05$ for both comparisons). This change in ritonavir CL_{ss}/F resulted in greater exposure to that drug for HCV+/FIB+ patients. Thus, ritonavir AUC_{12} , C_{max} and C_{min} in HCV+/FIB+ patients were 63%, 86% and 100%, respectively, greater than in HCV- patients, and 80%, 86% and 100%, respectively, greater than in HCV+/FIB- individuals (table III). These differences were not explained by sex or bodyweight (data not shown).

Discussion

Our results show that lopinavir pharmacokinetic parameters are not significantly affected by the presence of HCV co-infection in HIV-infected patients who show no signs of liver function impairment. However, despite the absence of hepatic insufficiency, increases in ritonavir concentrations in plasma may be relevant in this scenario, particularly in co-infected patients with advanced liver fibrosis.

Our findings of similar trough concentrations of lopinavir between HCV+ and HCV- patients are

Table II. Lopinavir pharmacokinetic parameters based on patient hepatitis C virus (HCV) status and FIB-4 score^a

Parameter	HCV- (n = 26)	HCV+ (n = 22)		p-Value ^b	
	(A)	(B) all (n = 22)	(C) FIB- (n = 8)		(D) FIB+ (n = 7)
AUC_{12} (mg • h/L)	83.4 (73.4–103.8)	99.3 (76.4–125.6)	96.0 (70.7–129.1)	102.5 (89.6–142.6)	NS
C_{max} (mg/L)	9.9 (8.7–12.3)	10.4 (9.2–12.6)	10.7 (9.1–13.2)	10.6 (9.9–14.4)	NS
C_{min} (mg/L)	6.1 (5.1–9.4)	8.2 (6.1–10.3)	7.6 (3.6–9.3)	8.1 (6.4–11.5)	NS
V_d/F (L)	44.0 (35.3–61.6)	56.9 (36.8–78.6)	47.7 (38.4–62.5)	98.9 (55.1–182.4)	0.015 A vs D 0.040 C vs D
CL_{ss}/F (L/h)	4.8 (3.9–5.4)	4.0 (3.2–5.2)	4.2 (3.1–5.7)	3.9 (2.8–4.5)	NS
λ_z (h ⁻¹)	7.1 (5.4–9.6)	10.0 (5.3–14.9)	7.6 (4.6–12.2)	14.9 (11.1–33.9)	0.005 A vs D

a Data are expressed as median (interquartile range).

b Comparisons were made with the Mann-Whitney nonparametric test.

λ_z = terminal elimination rate constant; AUC_{12} = area under the plasma concentration-time curve from 0 to 12 hours; CL_{ss}/F = apparent oral clearance at steady state; C_{max} = maximum plasma concentration; C_{min} = minimum plasma concentration; NS = not significant; V_d/F = apparent volume of distribution after oral administration.

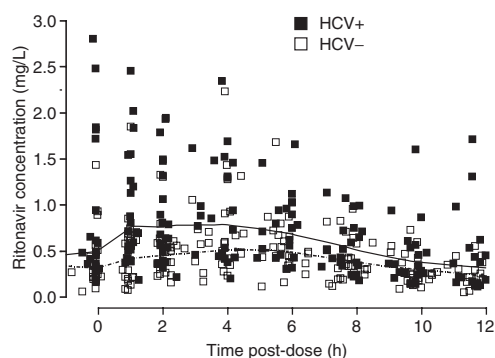


Fig. 2. Observed ritonavir plasma concentrations in hepatitis C virus (HCV)+ and HCV- patients. The continuous line represents the smooth function of the data for HCV+ patients; the dashed line represents the smooth function of the data for HCV- patients. Observations before and up to timepoint 0 hours represent data from samples obtained before drug administration.

consistent with reports from two different studies that compared lopinavir exposure between non-cirrhotic HIV-infected patients with or without HCV co-infection.^[11,12] However, those studies did not explore the influence of the extent of liver fibrosis on lopinavir exposure. In our study, neither HCV co-infection by itself nor the extent of liver fibrosis significantly influenced lopinavir exposure in our non-cirrhotic HIV-infected patients with normal liver function. However, ritonavir CL_{ss}/F in co-infected patients with advanced liver fibrosis was approxi-

mately 40% lower than in patients without liver fibrosis, regardless of HCV status. This finding indicates the greater relative influence of the extent of liver fibrosis than HCV co-infection alone on CYP activity and on the possibility of relevant drug accumulation, even in the absence of clinically evident liver function impairment.

It is well known that HCV co-infection is a risk factor for developing liver enzyme elevations in HIV-infected patients undergoing lopinavir/ritonavir therapy.^[8-13,21] However, the exact mechanisms underlying this effect are still being debated, and hypotheses concerning the nature of the relationships between histological features such as liver fibrosis and drug exposure and liver toxicity are still being formed. Aranzabal et al.^[18] assessed the influence of the extent of liver fibrosis on the development of liver toxicity in HIV-infected patients undergoing HAART, observing a 3-fold higher relative risk of liver toxicity in the presence of advanced fibrosis compared with only mild to moderate liver fibrosis. However, drug concentrations were not assessed. Two studies of the relationship between drug exposure and liver enzyme elevations in non-cirrhotic patients receiving lopinavir/ritonavir found no link between lopinavir trough concentrations and the development of severe hepatotoxicity.^[11,12] However, only lopinavir (not ritonavir) trough concentrations were determined in those studies. In our investigation we did study ritonavir, finding a higher

Table III. Ritonavir pharmacokinetic parameters based on patient hepatitis C virus (HCV) status and FIB-4 score^a

Parameter	HCV- (n = 26)	HCV+ (n = 22)		p-Value ^b	
	(A)	(B) all (n = 22)	(C) FIB- (n = 8)		(D) FIB+ (n = 7)
AUC_{12} (mg • h/L)	5.1 (4.0–6.6)	6.9 (4.5–10.4)	4.6 (3.6–7.2)	8.3 (5.8–17.2)	0.005 A vs D 0.040 C vs D
C_{max} (mg/L)	0.7 (0.6–1.3)	1.1 (0.7–1.6)	0.7 (0.5–1.1)	1.3 (0.9–1.9)	0.012 A vs D 0.040 C vs D
C_{min} (mg/L)	0.3 (0.2–0.5)	0.4 (0.3–0.8)	0.3 (0.2–0.4)	0.6 (0.5–1.3)	0.015 A vs B 0.003 A vs D 0.029 C vs D
V_d/F (L)	107.1 (61.1–182.3)	87.3 (67.1–142.3)	146.8 (81.4–176.4)	96.0 (50.7–134.6)	NS
CL_{ss}/F (L/h)	19.7 (15.2–24.7)	14.4 (9.6–22.1)	21.6 (13.9–27.7)	12.0 (5.8–17.3)	0.005 A vs D 0.040 C vs D
λ_z (h ⁻¹)	4.0 (2.7–5.1)	4.7 (3.8–5.5)	4.5 (3.9–6.5)	4.9 (4.2–5.5)	NS

a Data are expressed as median (interquartile range).

b Comparisons were made with the Mann-Whitney nonparametric test.

λ_z = terminal elimination rate constant; AUC_{12} = area under the plasma concentration-time curve from 0 to 12 hours; CL_{ss}/F = apparent oral clearance at steady state; C_{max} = maximum plasma concentration; C_{min} = minimum plasma concentration; NS = not significant; V_d/F = apparent volume of distribution after oral administration.

exposure to that drug, but not to lopinavir, in HIV/HCV co-infected patients with advanced liver fibrosis. The data from Aranzabal et al.^[18] and our results make it reasonable to hypothesise that the higher risk of adverse events reported in HCV/HIV co-infected patients receiving lopinavir/ritonavir could be at least partially explained by a higher exposure to ritonavir, but not to lopinavir, among patients with advanced liver fibrosis. Nonetheless, two limitations preclude exploring the clinical relevance of this issue: first, the cross-sectional design of the study, and second, the fact of enrolling patients on stable antiretroviral therapy. Thus, those patients who had experienced drug-related toxicity could have prematurely withdrawn from lopinavir/ritonavir treatment, and this could imply a selection bias when exploring the relationship between drug exposure and clinical outcomes in the present study.

Another pharmacokinetic parameter which was significantly modified in the presence of advanced liver fibrosis was the V_d/F of lopinavir. This parameter was increased in co-infected patients with advanced fibrosis (HCV+/FIB+) as compared with co-infected patients without liver fibrosis (HCV+/FIB-) or HCV- individuals. As is well known, lopinavir is extensively bound to albumin and α_1 -acid glycoprotein, which are both produced in the liver.^[19] Thus, the greater V_d/F of lopinavir observed in HCV+/FIB+ patients in our study might be explained by a lower albumin concentration in these subjects than in HCV- patients. Albumin concentrations also tended to be lower in HCV+/FIB+ than in HCV+/FIB- patients, although the difference was not statistically significant. However, the absence of statistically significant differences in albumin concentration between HCV+/FIB+ and HCV+/FIB- individuals may be related to the small sample size for this comparison. These results are consistent with those reported by Peng et al.^[17] in patients with mild to moderate liver function impairment. Those investigators also described a decrease in lopinavir protein binding in this setting.

We realise that liver biopsy remains the gold standard for assessing the severity of liver disease. However, this technique is not devoid of risk and may not be representative of the liver parenchyma in 20% of the cases.^[25] Thus, several non-invasive scoring systems to predict liver histology have

gained popularity in patients with HIV/HCV co-infection.^[23,26-29] The FIB-4 index is a simple scoring system that was developed and validated in two different sets of HIV-infected patients who participated in the APRICOT (AIDS Pegasys Ribavirin International Co-infection Trial) study and who had an available liver biopsy.^[23] This index has the advantage that it may be calculated along with routine laboratory tests, so it can be easily implemented in routine clinical practice and it correlates well with histology. In this regard, the negative predictive value of having advanced liver fibrosis when the FIB-4 score is ≤ 1.45 is 90%, and the positive predictive value when the FIB-4 score is ≥ 3.25 is 65%.^[23] However, a drawback of this scoring system is that the degree of liver damage is less predictable in patients with a FIB-4 score between 1.45 and 3.25. In order to take this into account, we did not include patients with FIB-4 scores in that range in the data analysis when assessing the influence of the extent of liver fibrosis on drug exposure. This approach reduced the statistical power of the study to detect significant differences on drug exposure when patients with different stages of liver fibrosis were compared. Additionally, the relatively low positive predictive value of having advanced liver fibrosis when the FIB-4 score is ≥ 3.25 means that patients with less severe liver damage might possibly have been misclassified as having advanced fibrosis. This could mean an underestimation of the actual influence of liver fibrosis on drug exposure in this study, and should be kept in mind when interpreting our results.

Conclusion

Lopinavir exposure was not increased in HIV/HCV co-infected patients without liver function impairment. However, ritonavir exposure may be higher in this setting, particularly in patients with advanced liver fibrosis. Further evaluation to fully assess the clinical impact of different exposure levels on liver toxicity is warranted.

Acknowledgements

José Moltó is supported by FIS through grant CM030135 from the Fundació per a la Recerca Biomèdica Germans Trias i Pujol, Badalona, in collaboration with the Spanish Health Department. Marta Valle is supported by FIS through grant

CP04/00121 from the Spanish Health Department in collaboration with Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. Mary Ellen Kerans assisted with English language of the manuscript. The authors have no conflicts of interest that are directly relevant to the content of this study.

References

1. Mocroft A, Soriano V, Rockstroh J, et al. Is there evidence for an increase in the death rate from liver-related disease in patients with HIV? *AIDS* 2005; 19: 2117-25
2. Martín-Carbonero L, Soriano V, Valencia E, et al. Increasing impact of chronic viral hepatitis on hospital admission and mortality among HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 1467-71
3. Bica I, McGovern B, Dhaz R, et al. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 492-7
4. Rosenthal E, Poiree M, Pradier C, et al. Mortality due to hepatitis C-related liver disease in HIV-infected patients in France (Mortavic 2001 study). *AIDS* 2003; 17: 1803-9
5. Gonzalez-García JJ, Mahillo B, Hernandez S, et al. Prevalence of hepatitis virus coinfection and indications for chronic hepatitis C virus treatment and liver transplantation in Spanish HIV-infected patients. The GESIDA 29/02 and FIPSE 12185/01 Multicenter Study. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23: 340-8
6. Arribas JR, Gonzalez-García JJ, Lorenzo A, et al. Single (B or C), dual (BC or BD) and triple (BCD) viral hepatitis in HIV-infected patients in Madrid, Spain. *AIDS* 2005; 19: 1361-5
7. Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L, et al. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1-5
8. Sulkowski MS, Thomas DL, Chaisson RE, et al. Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection. *JAMA* 2000; 283: 74-80
9. Sulkowski MS, Mehta SH, Chaisson RE, et al. Hepatotoxicity associated with protease inhibitor-based antiretroviral regimens with or without concurrent ritonavir. *AIDS* 2004; 18: 2277-84
10. Puota M, Torti C, Ripamonti D, et al. Severe hepatotoxicity during combination antiretroviral treatment: incidence, liver histology, and outcome. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32: 259-67
11. Gonzalez-Requena D, Nuñez M, Jimenez-Nacher I, et al. Liver toxicity of lopinavir-containing regimens in HIV-infected patients with or without hepatitis C coinfection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 698-700
12. Canta F, Marrone R, Bonora S, et al. Pharmacokinetics and hepatotoxicity of lopinavir/ritonavir in non-cirrhotic HIV and hepatitis C virus (HCV) co-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 280-1
13. Meraviglia P, Schiavini M, Castagna A, et al. Lopinavir/ritonavir treatment in HIV antiretroviral-experienced patients: evaluation of risk factors for liver toxicity. *HIV Med* 2004; 5: 334-43
14. Wyles DL, Gerber JG. Antiretroviral drug pharmacokinetics in hepatitis with hepatic impairment. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 174-81
15. Regazzi M, Maserati R, Villani P, et al. Clinical pharmacokinetics of nelfinavir and its metabolite M8 in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-hepatitis C virus-coinfected subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 643-9
16. Veronese L, Rautureau J, Sadler BL, et al. Single-dose pharmacokinetics of amprenavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, in subjects with normal or impaired hepatic function. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 821-6
17. Peng JZ, Pulido F, Causemaker SJ, et al. Pharmacokinetics of lopinavir/ritonavir in HIV/hepatitis C virus-coinfected subjects with hepatic impairment. *J Clin Pharmacol* 2006; 46: 265-74
18. Aranzabal L, Casado JL, Moya J, et al. Influence of liver fibrosis on highly active antiretroviral therapy-associated hepatotoxicity in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 588-93
19. Kaletra (lopinavir/ritonavir). Prescribing information (USA). North Chicago (IL): Abbott Laboratories, 2003
20. Norvir (ritonavir). Prescribing information (USA). North Chicago (IL): Abbott Laboratories, 2001
21. Da Silva B, King M, Cernohous P, et al. Lopinavir/ritonavir (LPV/r) safety, tolerability and efficacy in HIV patients co-infected with hepatitis C and/or hepatitis B: review of clinical trials [abstract no. MoPeB3285]. XV International AIDS Conference; 2004 Jul 11-16; Bangkok
22. Pugh RNH, Murray-Lyon LM, Dawson JL, et al. Transection of the esophagus in bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60: 648-52
23. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006; 6: 1317-25
24. Droste JAH, Aarnoutse RE, Koopmans PP, et al. Evaluation of antiretroviral drug measurements by an interlaboratory quality control program. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32: 287-91
25. Maharaj B, Maharaj R, Leary W, et al. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* 1986; I: 523-5
26. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple non-invasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 3: 12-8
27. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357: 1069-75
28. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128: 343-50
29. Nunes D, Fleming C, Offner G, et al. HIV infection does not affect the performance of non-invasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40: 538-44

Correspondence and offprints: *José Moltó*, Fundació Lluita contra la SIDA, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Ctra de Canyet, s/n, 08916 Badalona Barcelona, Spain.
E-mail: jmolto@flsida.org

ESTUDIO 3

Simultaneous Population Pharmacokinetic Model for Lopinavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults.

Clinical Pharmacokinetics 2008; (en prensa).

Simultaneous Population Pharmacokinetic Model for Lopinavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults

José Moltó^{1,2}, Manuel José Barbanj^{2,3}, Cristina Miranda¹, Asunción Blanco⁴, José Ramón Santos¹, Eugenia Negro¹, Joan Costa⁵, Pere Domingo⁶, Bonaventura Clotet^{2,4}, Marta Valle^{2,3}

¹"Lluita contra la SIDA" Foundation, Germans Trias i Pujol Hospital, Badalona, Spain; ²Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Centre d'Investigació del Medicament, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁴"IrsiCaixa" Foundation, Germans Trias i Pujol Hospital, Badalona, Spain; ⁵Department of Clinical Pharmacology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain ⁶Department of Internal Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona, Spain.

SUMMARY

Background: Lopinavir is a protease inhibitor indicated for the treatment of HIV infection which is co-formulated with low doses of ritonavir in order to enhance its pharmacokinetic profile. After oral administration, lopinavir plasma concentrations can vary widely between different HIV-infected patients.

Objective: To develop and validate a population pharmacokinetic model for lopinavir and ritonavir administered simultaneously in a population of HIV-infected adults. The model sought was to incorporate patient characteristics influencing variability in drug concentration and the interaction between the two compounds.

Methods: HIV-infected adults on stable therapy with oral lopinavir/ritonavir in routine clinical practice for at least 4 weeks were included. A concentration–time profile was obtained for each patient, and blood samples were collected immediately before and 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 hours after a morning lopinavir/ritonavir dose. Lopinavir and ritonavir concentrations in plasma were determined by high performance liquid chromatography. First, a population pharmacokinetic model was developed for lopinavir and for ritonavir separately. Pharmacokinetic parameters, interindividual variability and residual error were estimated, and the influence of different patient characteristics on the pharmacokinetics of lopinavir and ritonavir was explored. Then, a simultaneous model estimating the pharmacokinetics of both drugs together and incorporating the influence of ritonavir exposure on lopinavir plasma clearance (CL/F) was developed. Population analysis was performed using non-linear effects modeling (NONMEM, version V). Bias and precision of the

final model was assessed through Monte Carlo simulations and data splitting techniques.

Results: A total of 53 and 25 Caucasian patients were included in two datasets for model-building and model-validation, respectively. Lopinavir and ritonavir pharmacokinetics were described with one-compartment models with first order absorption and elimination. The presence of advanced liver fibrosis decreased ritonavir CL/F of ritonavir by nearly half (18.8 vs 11.1 L/h). Lopinavir volume of distribution (V/F) and CL/F were reduced as 1-acid glycoprotein (AAG) concentrations increased. Lopinavir CL/F was inhibited by ritonavir concentrations following a maximum effect model ($I_{\max} = 1$, $IC_{50} = 0.36$ mg/L). The final model appropriately predicted plasma concentrations in the model-validation dataset, with no systematic bias and adequate precision.

Conclusion: A population model to simultaneously describe the pharmacokinetics of lopinavir and ritonavir was developed and validated in HIV-infected patients. Bayesian estimates of the individual parameters of ritonavir and lopinavir could be useful to predict lopinavir exposure based on the presence of advanced liver fibrosis and AAG concentration in an individual manner with the aim of maximizing the chances of treatment success.

INTRODUCTION

The introduction of protease inhibitors of the human immunodeficiency virus (HIV) in the middle 1990s resulted in a marked suppression of viral replication for most HIV-infected patients. However, therapy fails to maintain viral suppression in a significant proportion of patients over the long term,^[1] and incomplete suppression may lead to the eventual development of drug-resistant viruses. Although treatment failure has complex causes, inadequate drug exposure plays an important role in its development.

Lopinavir is one of the most widely-used protease inhibitors for the treatment of HIV infection. It exerts a high intrinsic antiretroviral potency against viral strains coming from either antiretroviral naïve or antiretroviral experienced subjects.^[2-4] However, due to its low oral bioavailability and to its extensive metabolism by the cytochrome P450 (CYP) 3A4 isoenzyme, lopinavir needs to be co-administered with low doses of ritonavir to achieve drug concentrations high enough to inhibit viral replication.^[2] Ritonavir

boosts lopinavir concentrations through two different mechanisms.^[5-7] First, it improves lopinavir bioavailability by inhibiting intestinal CYP3A4 and the cellular efflux protein P-glycoprotein. Second, ritonavir reduces lopinavir hepatic metabolism by inhibiting CYP3A4 in the liver. Thus, when both agents are co-administered, lopinavir trough concentrations in plasma largely exceed the concentration required to inhibit viral replication of wild-type strains of HIV-1.^[2] Even so, several studies have demonstrated that lopinavir concentrations in plasma may vary widely among HIV-infected patients, and that a non-negligible number of patients may have lopinavir concentrations lower than the proposed minimum effective concentration, particularly when the individual has been previously exposed to other protease inhibitors.^[8-10]

The relationship between lopinavir exposure and the chance of attaining durable viral suppression in patients receiving therapy with lopinavir/ritonavir has been described, particularly in patients previously treated with protease inhibitors harboring viruses with

partial resistance to lopinavir.^[11, 12]

However, the degree of viral resistance and lopinavir concentrations may be largely unpredictable, with a non-negligible proportion of patients showing lopinavir concentrations that are insufficient for overcoming pre-existing resistance to protease inhibitors.^[8-10] Thus, combining information concerning drug exposure and viral susceptibility may be a better means of optimizing antiretroviral therapy than using drug concentrations or resistance testing alone.

The inhibitory quotient (IQ), defined as the quotient between the trough concentrations of a drug in a patient and the susceptibility of the virus in that patient to that drug,^[13] has been shown to be a better predictor of treatment response to lopinavir/ritonavir therapy than pharmacokinetic or resistance data alone.^[14-17] Thus, the IQ may allow us to identify the target lopinavir trough concentration needed to attain complete viral suppression in each individual patient and, subsequently, to modify the lopinavir dose in an individualized fashion.

Dosage modifications based on target-concentrations require accurate knowledge of pharmacokinetic parameters governing drug absorption, distribution and elimination, and their variability among different individuals.^[18] This knowledge is acquired by means of population pharmacokinetic models which, in addition, permit the exploration of individual characteristics linked to variability in drug concentrations as well as the simulation of drug concentrations achieved in each particular subject when different doses of the drug are administered.

The objective of the present study was to develop and to validate a population pharmacokinetic model for lopinavir and ritonavir administered simultaneously. The model sought was to incorporate patient characteristics influencing variability in drug concentration as well as the interaction between the two compounds in a population of HIV-infected adults.

METHODS

This was a cross-sectional study in 78 HIV-infected patients from

multiple sites in Catalonia, Spain (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona; Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; Hospital General de Vic, Vic; Hospital de Figueres, Figueres). Participants were aged 18 years or older who had been receiving stable antiretroviral therapy with oral lopinavir/ritonavir (Kaletra soft gel capsules, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) for at least 4 weeks. Self-reported treatment adherence lower than 90% within the previous two weeks, pregnancy, and concomitant administration of other drugs affecting lopinavir/ritonavir pharmacokinetics^[19] were considered exclusion criteria. The protocol was approved by the ethics committee of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol and by the equivalent review board at each additional site. All subjects signed written consent before enrolment.

Demographic and clinical variables, including age, sex, weight, time since HIV diagnosis, HCV antibodies, and concomitant medications, including over-the-counter medications, were recorded. In addition, a complete

blood cell count, prothrombin time and analysis of serum chemistry (creatinine, total protein, albumin, -1 acid glycoprotein [AAG], total bilirubin, aspartate aminotransferase [AST], alanine aminotransferase [ALT], -glutamyl transferase [GGT], and alkaline phosphatase), CD4⁺ T lymphocyte cell count and HIV-1 RNA load were determined.

The influence of the extent of liver fibrosis on lopinavir and ritonavir exposure was assessed in HIV/HCV co-infected patients with the FIB-4 index. Based on this score, HCV-positive (HCV+) patients were grouped into three categories: no liver fibrosis (HCV+/FIB-, FIB-4 ≤ 1.45), advanced liver fibrosis (HCV+/FIB+, FIB-4 ≥ 3.25), and indeterminate degree of liver fibrosis (HCV+/FIB?, FIB-4 ranging from 1.45 to 3.25).^[20]

Sample collection and analytical determinations.

Individual patient concentration-time profiles were obtained and blood samples were collected immediately before (0), and 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours after a

witnessed lopinavir/ritonavir morning dose. Lopinavir/ritonavir capsules were given with a standard meal consisting of at least 300 kilocalories.^[19] Patients recorded the time they had last taken a lopinavir/ritonavir dose on the day before the visit, and the exact times of dosing and blood sampling during the visit were recorded. To assess the inter-occasion variability in the pharmacokinetic parameters, samples collected at random time points within the scope of routine therapeutic drug monitoring were considered from the same patients, when available.

Blood samples for determination of drug concentrations in plasma were collected in potassium and ethylenediaminetetraacetic acid-containing tubes. Plasma was isolated by centrifugation (1500g, 15 minutes), and stored at -20°C until analysis. Lopinavir and ritonavir plasma concentrations were simultaneously determined by high-performance liquid chromatography with a photo diode array detector (HPLC-PDA 2996, Waters, Barcelona, Spain), according to a validated method. The analytical column was a

NovaPak C18 3.9×150 mm with a NovaPak C18 guard column (Waters). The method involved liquid-liquid extraction with tert-butyl methyl ether after adjusting the pH to 11.5 and a second wash with hexane. The mobile phase consisted of a gradient elution with phosphate buffer acetonitrile (pH 6.70). The method was linear over the range of 0.05 to 20 mg/L for both drugs. The inter- and intra-day coefficients of variation were 2.4-7.1% and 2.7-4.3% for lopinavir, respectively, and 2.9-3.6% and 3.4-4.5% for ritonavir. The assay was externally validated by the International Interlaboratory Quality Control Program for Therapeutic Drug Monitoring in HIV Infection (KKGIT, Nijmegen, The Netherlands).^[21]

Pharmacokinetic analysis

Patients were randomly divided in a 2:1 fashion into a model-building dataset ($n=53$), and a model-validation dataset ($n=25$) before the analyses.

Non-linear mixed effects modeling was performed with NONMEM (version V, Globomax LLC, Ellicott City, Maryland, USA),^[22] using a

Fortran compiler (Compaq Visual Fortran Version 6.0, Compaq Computer Corporation, Houston, TX, USA). All models were fitted using the first-order conditional estimation (FOCE) procedure with interaction between inter-patient, inter-occasion and residual variability.

The model-building process consisted of three stages: 1) a population pharmacokinetic model was developed for lopinavir; 2) a population pharmacokinetic model was developed for ritonavir; and 3) a simultaneous model estimating the pharmacokinetics of both drugs together and incorporating the influence of ritonavir exposure on the plasma clearance of lopinavir was developed.

Pharmacokinetic model-building for lopinavir and ritonavir started with the development of a structural model. Then, inter-patient and inter-occasion variability of the parameters (basic model) was added; finally, the influence of patient characteristics on the variability of the parameters (intermediate model). To simultaneously analyze lopinavir and ritonavir pharmacokinetics, the

lopinavir and ritonavir intermediate models which best described lopinavir and ritonavir plasma concentrations separately were considered.

The adequacy of the tested models was evaluated using statistical and graphic methods. The minimum value of the objective function (OF) provided by NONMEM was used to discriminate between hierarchical models using the log likelihood test. A model was considered superior to the other nested model when the OF was reduced by at least 3.84 points ($p < 0.05$). An OF with an approximate χ^2 distribution with 1 degree of freedom was the basis for this criterion. The precision of the parameter estimates was assessed calculating the standard error for all parameters with the covariance option in NONMEM. In addition, the S-plus (MathSoft Inc, Seattle, WA, USA) software and its based model building aid Xpose, version 3.1^[23] were used for goodness-of-fit plots and other graphic model diagnosis.

Basic model

Disposition characteristics of lopinavir and ritonavir were determined by fitting one- and two-compartment models with linear and nonlinear elimination to the data. To describe drug absorption, models assuming either first- or zero-order rate of absorption with and without absorption lag-time were tested.

Exponential errors following a log-normal distribution were assumed for the description of the inter-patient and inter-occasion variability of the parameters:

$$y_{ij} = \mu \cdot \exp(\epsilon_i + \kappa_j) \quad \text{eq.1}$$

where y_{ij} is the pharmacokinetic parameter of the i^{th} individual on the j^{th} occasion, μ the average population value, ϵ_i is the inter-patient random effect with a mean 0 and a variance σ^2 , and κ_j is the inter-occasion random effect with a mean 0 and a variance π^2 .

Residual variability was modeled initially with a combined error model. If one of the components (additive or proportional) of the

residual error was negligible, it was deleted from the model.

In order to account for possible under-compliance in some patients, inclusion of inter-patient and inter-occasion variability in the apparent bioavailability (F) was tested following an exponential error model.

Intermediate model

Once a basic lopinavir or ritonavir model provided an adequate description of the data, the influence of the patient characteristics on the variability of the parameters was explored through graphic methods and with the generalized additive model (GAM) approach as implemented in Xpose.

Evaluated covariates included age, sex, weight, HCV co-infection (and FIB-4 index in HCV+ patients), and total protein, albumin, AAG, AST, and ALT concentrations in plasma. In addition, ritonavir area under the observed concentration-time curve during the dose interval (AUC_{0-12}) was calculated for each individual by means of the linear trapezoidal rule using WinNonlin software

(Version 2.0; Pharsight, Mountain View, CA, USA), and its influence on lopinavir clearance was explored according to linear, exponential and maximum effect functions. The same process was performed to assess the potential influence of lopinavir exposure in ritonavir clearance.

Those covariates selected by GAM as significantly related to the parameters were further tested for significance in NONMEM using the forward inclusion and backward elimination approach. A covariate was introduced into the model when its inclusion decreased the OF by at least 3.84 points ($p < 0.05$), and reduced the inter-patient variability in the parameters. During the backward elimination procedure, a covariate was only retained in the model when its influence was statistically significant ($p < 0.01$), and clinically relevant (changes in the typical value of the parameter of interest of at least 10% within the range of the covariate in the population).

Influence of ritonavir concentrations on lopinavir clearance (final model)

The lopinavir and ritonavir models incorporating covariates, which best described lopinavir and ritonavir plasma concentrations separately (intermediate models) were considered as the starting point to simultaneously analyze lopinavir and ritonavir pharmacokinetics. In these models the inhibition of lopinavir clearance by ritonavir was assumed to be dependent on ritonavir concentration at each time point, and not a function of AUC for ritonavir as in the intermediate lopinavir model. This inhibition was explored using different mathematical models.

Direct effect models

Different models assuming a direct relationship between ritonavir concentrations in plasma and lopinavir plasma clearance were tested

eq. 2

$$CL/F_{LPV} = \theta_{CL/F_{LPV}} \times I(t)$$

where CL/F_{LPV} is lopinavir plasma clearance, $\theta_{CL/F_{LPV}}$ is the value of CL/F_{LPV} in the absence of ritonavir, and $I(t)$ represents the inhibition of CL/F_{LPV} by ritonavir.

This process was modeled according to a linear (equation 3) or a maximum effect function (equation 4):

eq. 3

$$I(t) = 1 - (SLP \times RTV)$$

where RTV is ritonavir plasma concentration and SLP is the parameter governing the negative linear relationship between RTV and $\theta_{CL/F_{LPV}}$.

eq. 4

$$I(t) = 1 - \left[I_{\max} \times RTV / (IC_{50} + RTV) \right]$$

where I_{\max} is the maximum inhibitory effect of ritonavir on CL/F_{LPV} , and IC_{50} is RTV producing 50% of I_{\max} .

Indirect effects models

The reversible inhibition of the enzyme responsible for lopinavir metabolism (ENZ) caused by ritonavir was modeled throughout an indirect response model representing the stimulation of the degradation of ENZ. In this model, the rate of change of ENZ over time was described as:

eq. 5

$$\frac{dENZ}{dt} = K_{ENZ} - K_{ENZ} \times ENZ \times S(t)$$

where $dENZ/dt$ is the rate of change of ENZ, K_{ENZ} represents the rate of turnover, ENZ is assumed to be stationary with an initial value of 1, and $S(t)$ represents the stimulation process. This process was modeled according to a linear or a maximum effect function.

Model validation

The final model was validated by means of Monte Carlo simulations and data splitting techniques. For Monte Carlo simulations, 1000 individual concentration-time profiles of ritonavir and lopinavir were generated using the fixed and random population estimates obtained from the model, and the median profile and the intervals including 90% of the simulated concentrations were plotted together with the raw data. The agreement between simulations and observations was judged visually. In addition, for the data-splitting validation, the fixed and random estimates obtained from the model-building dataset were used to predict individual lopinavir and ritonavir concentrations in the model-validation dataset, which were plotted and compared with actual concentration values. Mean

prediction error (MPE) as a measure of bias and root mean squared error (RMSE) as a measure of precision, and their 95% confidence intervals (95% CI), were calculated following equations (6) and (7), respectively.^[24]

eq. 6

$$MPE = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (C_{obs,j} - C_{pred,j})$$

eq. 7

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (C_{obs,j} - C_{pred,j})^2}$$

where N is the number of data points, $C_{obs,j}$ and $C_{pred,j}$ are the j^{th} observed and predicted concentrations, respectively.

To compare the fit of the intermediate and final models for lopinavir, the intermediate lopinavir model was also validated following the same procedures.

RESULTS

Fifty-three and twenty-five Caucasian patients were included in the model-building and in the model-validation datasets, respectively. The lopinavir/ritonavir dose was 400/100 mg twice daily

in all but two subjects in the model-building dataset who were receiving 266/66 mg twice daily. Table 1 summarizes other characteristics of the patients. The time course of lopinavir and ritonavir observations from the patients included in the model-building dataset are shown in Figures 1 and 2, respectively.

Basic and intermediate models for lopinavir

A one-compartment model with first-order absorption and elimination best described the pharmacokinetics of lopinavir. Models with zero-order absorption and with two compartments did not adequately fit the data. Nor did the addition of an absorption lag-time or the assignment of inter-patient variability on k_a improve the model. The proportional component of the initial combined error model used to describe residual variability was negligible, and it was removed from the model. No correlation between inter-patient and inter-occasion variability was observed. Table 2 summarizes the parameter estimates for the basic lopinavir model.

Table 1. Demographic characteristics of the patients included in the model-building and in the external-validation datasets

	Model building n = 53	Model validation n = 25
Sex (male) ^a	39 (73.6)	16 (64.0)
Age (years)	43.0 (8.3)	42.8 (9.2)
Weight (kg)	67.7 (11.5)	65.8 (11.8)
Height (m)	1.69 (0.79)	1.59 (0.38)
Time since HIV diagnosis (years)	9.5 (5.6)	11.5 (4.4)
HCV co-infection ^a	31 (58.5)	11 (44.0)
Advanced liver fibrosis ^a	7 (13.2)	3 (12.0)
Time on lopinavir/ritonavir therapy (weeks)	86.0 (56.9)	129.1 (141.3)
Reverse transcriptase inhibitors ^a		
Zidovudine	6 (11.3)	–
Lamivudine	32 (60.4)	18 (72.0)
Stavudine	7 (13.2)	–
Didanosine	11(20.7)	12 (48.0)
Abacavir	11(20.7)	8 (32.0)
Tenofovir	31 (58.5)	11 (44.0)
AST (IU/l)	35.9 (22.7)	46.6 (40.2)
ALT (IU/l)	40.7 (34.4)	44.3 (33.9)
Proteins (g/dl)	7.3 (0.6)	7.7 (0.6)
Albumin (g/dl)	4.3 (0.4)	4.3 (0.4)
AAG (mg/dl)	78.5 (22.5)	75.1 (24.8)
CD4 ⁺ T cell count (cells/mm ³)	468 (260)	529 (311)
HIV-1 RNA < 50 copies/ml ^a	43 (81.1)	18 (72.0)

Data are expressed as mean (standard deviation) except when noted. HCV, hepatitis C virus; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AAG, α 1-acid glycoprotein.

^a n (%)

Table 2. Parameter estimates of basic and intermediate pharmacokinetic models for lopinavir and ritonavir

	Basic model		Intermediate model	
	Estimate	RSE (%)	Estimate	RSE (%)
Lopinavir				
CL/F (l/h)	4.31	4.3	12.3	29
_{AAG-CL}	–	–	0.006	26
V/F (l)	98.8	19	90.3	9.6
_{AAG-V}	–	–	0.01	45
k_a (h^{-1})	0.85	37	0.85 (fix)	–
IIV CL/F (%)	30	21	22	26
IIV V/F (%)	50	68	37	64
I_{max}	–	–	1 (fix)	–
AUC ₅₀ (mg·h/l)	–	–	3.44	47
Residual error (mg/l)	1.9	22	1.7	26
Ritonavir				
CL/F (l/h)	17.9	6.5	19.1	5.7
_{FIB}	–	–	0.57	17
V/F (l)	40	32	55	19
k_a (h^{-1})	0.11	20	0.17	9.8
IIV CL/F (%)	43	26	–	–
IIV V/F (%)	96	45	89	39
IOV F (%)	–	–	56	22
Residual error (%)	41	11	33	15

CL/F, oral clearance; _{AAG-CL}, influence of α 1-acid glycoprotein concentration in plasma on lopinavir CL/F; V/F, apparent volume of distribution; _{AAG-V}, influence of α 1-acid glycoprotein concentration on lopinavir V/F; k_a , absorption rate constant; _{FIB}, influence of advanced liver fibrosis on ritonavir CL/F; F, apparent bioavailability; IIV, inter-patient variability; IOV, inter-occasion variability; I_{max} , maximum inhibitory effect of ritonavir on the lopinavir CL/F; AUC₅₀, area under the ritonavir time-concentration curve during the dose interval which is associated with half-maximal inhibition of lopinavir CL/F; RSE, relative standard error (as calculated with the covariance option of NONMEM).

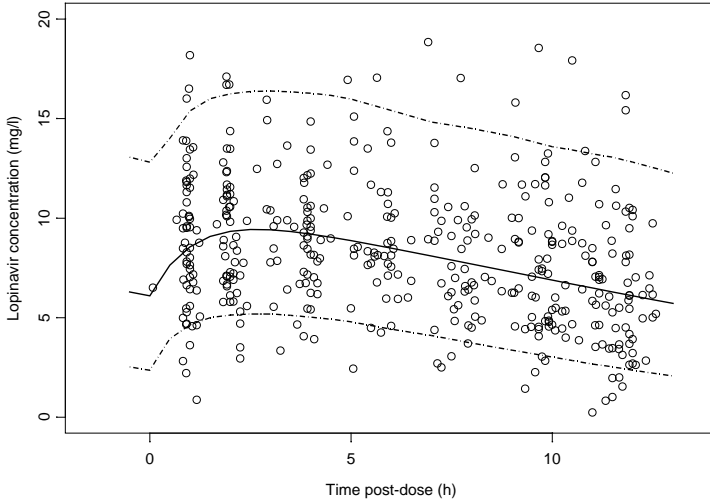


Figure 1. Lopinavir plasma concentrations in patients receiving a dose of 400 mg twice daily. The median population prediction (solid line) and the 90% prediction interval (broken lines) are also shown.

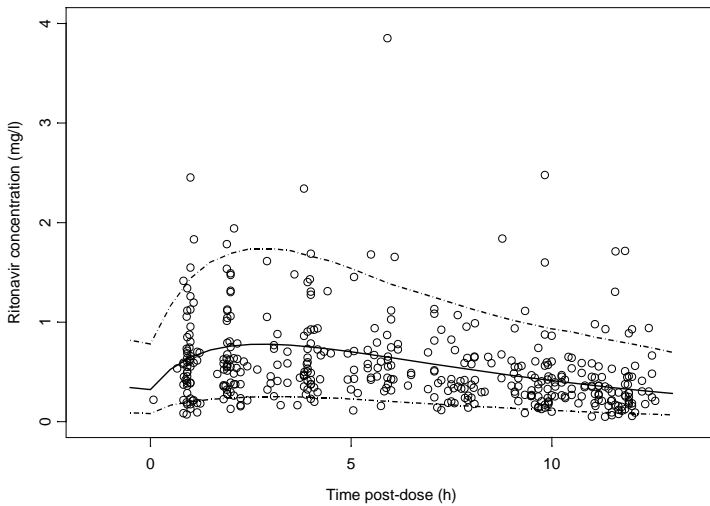


Figure 2. Ritonavir plasma concentrations in patients receiving a dose of 100 mg twice daily. The median population prediction (solid line) and the 90% prediction interval (broken lines) for the final pharmacokinetic model are also shown.

The model building steps for the lopinavir covariate analysis are summarized in Table 3. The inclusion of the effect of the AUC

for ritonavir on lopinavir CL/F following a maximum effect function significantly improved goodness of fit (OF = -98.8).

Table 3. Summary of the models used to examine the influence of patients' covariates on lopinavir and ritonavir pharmacokinetics

	Hypothesis	Model	OF
Lopinavir model			
(1)	Does ritonavir AUC influence CL?	$CL = a \cdot (1 - AUC / (b + AUC))$	-98.8
(2)	Does FIB influence CL?	$CL = a - (b \cdot FIB)$	-1.9
(3)	Does AAG influence CL?	$CL = a \cdot (\exp(-b \cdot (AAG - 77)))$	-6.3
(4)	Does SEX influence V? ^a	$V = a \cdot b^{SEX}$	-2.9
(5)	Does AAG influence V?	$V = a \cdot (\exp(-b \cdot (AAG - 77)))$	-8.2
(6)	Does RTV AUC influence CL, and AAG influence V?	$CL = a \cdot (1 - AUC / (b + AUC))$ $V = c \cdot (\exp(-d \cdot (AAG - 77)))$	-7.7 ^b
(7)	Does RTV AUC and AAG influence CL, and AAG influence V?	$CL = a \cdot (1 - AUC / (b + AUC))$ $CL = c \cdot (\exp(-d \cdot (AAG - 77)))$ $V = e \cdot (\exp(-e \cdot (AAG - 77)))$	-13.4 ^c
Ritonavir model			
(8)	Does FIB influence CL?	$CL = a \cdot b^{FIB}$	-15.1
(9)	Does AAG influence V?	$V = a - (b \cdot AGA)$	-4.6

OF, difference in the NONMEM objective function compared to the basic structural model including no covariates; AUC, area under the time-concentration curve; FIB = advanced liver fibrosis (1 for individuals HCV+/FIB+ and 0 for all others); AAG = α 1-acid glycoprotein concentration in plasma (mg/dl)

^a SEX, 1 for females and 0 for males.

^b Compared with model 1.

^c Compared with model 6.

The inclusion of the effect of the AAG concentration on lopinavir CL/F and V/F further decreased the objective function by , with a significant effect on the parameters of lopinavir. The parameter estimates for the intermediate lopinavir model are given in Table 2.

The inclusion of inter-occasion variability in the apparent lopinavir bioavailability (F) did not result in an improvement of the model fit, consequently this parameter was not included in the intermediate selected model.

Basic and intermediate models for ritonavir

A one-compartment model with first-order absorption and elimination best described the pharmacokinetics of ritonavir. Models with zero-order absorption and with two compartments did not adequately fit the data. The data did not support the addition of an absorption lag-time or the assignment of inter-patient variability on k_a . In addition, the additive component of the initial combined error model used to describe residual variability was negligible, and it was removed

from the model. No correlation between inter-patient and inter-occasion variability was observed. Table 2 lists the fixed and random effects estimated in the basic ritonavir model.

The model building steps for the ritonavir covariate analysis are summarized in Table 3. The introduction of the presence of advanced liver fibrosis (HCV+/FIB+) statistically improved the fit (OF = -15.1) and it had a significant effect on the ritonavir CL/F, which was 57% lower in the presence of advanced liver fibrosis. Neither the AUC for lopinavir nor other covariates were significantly related to ritonavir pharmacokinetics.

The inclusion of inter-occasion variability in the apparent ritonavir F resulted in a further optimization of the model (OF = -57.8), reducing residual variability from 41% to 33%, and inter-patient variability in the ritonavir CL/F from 37% to less than 1%. Consequently, inter-patient variability in ritonavir CL/F was not maintained in the model. The parameter estimates for the

intermediate ritonavir model are given in Table 2.

Final simultaneous lopinavir and ritonavir model

In order to attain successful minimization of the models, lopinavir k_a was fixed to the final estimate of the intermediate lopinavir model. The inhibition of lopinavir CL/F by ritonavir

concentrations was best described by a maximum effect model. The maximum inhibitory effect of ritonavir on lopinavir clearance was estimated as 1, and it was fixed to this value. The estimated concentration of ritonavir associated with half-maximal inhibition of lopinavir CL/F (IC_{50}) was 0.365 mg/l.

Table 4. Parameter estimates of the final simultaneous pharmacokinetic model for lopinavir and ritonavir

	Estimate	RSE (%)	IIV (%)	RSE (%)
Lopinavir				
CL/F (l/h)	11	31	12	60
$AAG-CL$	0.005	36		
V/F (l)	91.6	9.7	38	59
$AAG-V$	0.01	45	–	–
k_a (h^{-1})	0.85 (fix)	-	–	–
I_{max}	1 (fix)	-	–	–
IC_{50} (mg/l)	0.36	-	28	67
Residual error (mg/l)	1.6	13	–	–
Ritonavir				
CL/F (l/h)	18.8	5.9	–	–
FIB	0.59	17	–	–
V/F (l)	54.7	21	81	48
k_a (h^{-1})	0.18	13	–	–
IOV F	58	19	–	–
Residual error (%)	34	16	–	–

CL/F, plasma clearance; $AAG-CL$, influence of α 1-acid glycoprotein concentration in plasma on lopinavir CL/F; V/F, apparent volume of distribution; $AAG-V$, influence of α 1-acid glycoprotein concentration on lopinavir V/F; k_a , absorption rate constant; FIB , influence of advanced liver fibrosis on ritonavir CL/F; F, apparent bioavailability; IIV, inter-patient variability; IOV, interoccasion variability; I_{max} , maximum inhibitory effect of ritonavir on the lopinavir CL/F; IC_{50} , ritonavir concentration which is associated with half-maximal inhibition of lopinavir CL/F; RSE, relative standard error (as calculated with the covariance option of NONMEM)

Other parameters estimated by the model are summarized in Table 4.

Goodness-of-fit plots for lopinavir and for ritonavir are shown in Figures 3 and 4, respectively. Observations vs population or individual predictions did not show

any clear bias. The residuals appeared to be distributed evenly around the population-predicted concentration, and the majority of weighted-residuals lie within two standard deviations of the mean.

We also attempted an exploration of the reversible inhibition of the

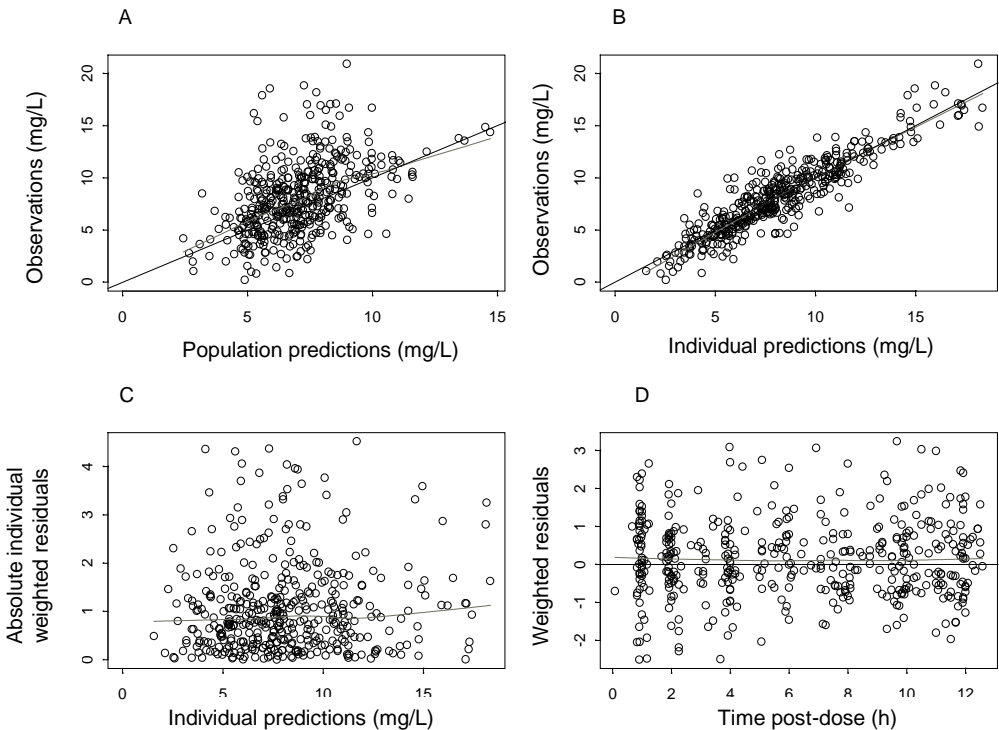


Figure 3. Goodness-of-fit plots of the final simultaneous model for lopinavir. Grey lines are smooth curves of the ordinate values. A, observed concentrations vs population predictions, the black line is the line of identity. B, observations vs individual predictions, the black line is the line of identity. C, absolute individual weighted residuals vs individual predictions. D, population weighted residuals vs time post-dose, the black line is at ordinate value zero.

enzyme responsible for lopinavir metabolism caused by ritonavir using indirect response models.

However, the data did not support these models and minimization was not successfully attained.

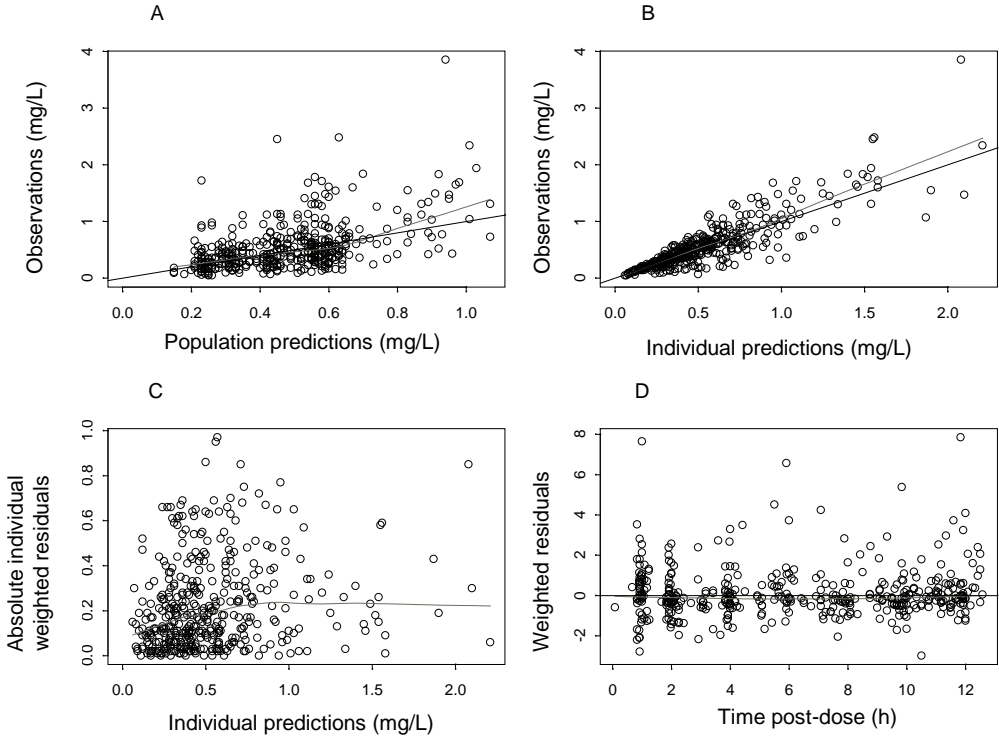


Figure 4. Goodness-of-fit plots of the final simultaneous model for ritonavir. Grey lines are smooth curves of the ordinate values. A, observed concentrations vs population predictions, the black line is the line of identity. B, observations vs individual predictions, the black line is the line of identity. C, absolute individual weighted residuals vs individual predictions. D, population weighted residuals vs time post-dose, the black line is at ordinate value zero.

Model validation

The observed concentrations in the model-building dataset and the 90% prediction intervals for lopinavir and ritonavir obtained using Monte Carlo simulations with the final model are represented in Figures 1 and 2, respectively. The comparison of the predictions obtained for lopinavir from the intermediate and final model showed that the prediction interval obtained with the final model encompassed the observed concentration-time data more adequately than the one obtained with the intermediate model. The proportions of observations above the 90% prediction interval were 15.5% and 3.7% for the intermediate and the final lopinavir models, respectively ($p < 0.001$), while the proportions of lopinavir observations below the 90% prediction interval were similar in the two models (2.1% vs 7.0% respectively, $p = 0.51$).

Characteristics of the 25 patients included in the model-validation dataset are summarized in Table 1. Individual lopinavir and ritonavir predictions obtained with the final model vs actual concentrations in the model-validation dataset are

shown in Figure 5. Although there was a slight trend to underestimate ritonavir concentrations higher than 1 mg/l, no bias in individual lopinavir predictions was observed. Table 5 summarizes bias and precision for the intermediate and the final lopinavir models. None of the models had systematic bias. However, the predictive performance (precision) was generally better for the final lopinavir model than for the intermediate one.

DISCUSSION

A simultaneous population pharmacokinetic model for lopinavir and ritonavir incorporating the relationship between ritonavir concentrations and lopinavir CL/F was developed in the present study. Our major findings were 1) the decrease of ritonavir CL/F in patients co-infected with HCV, particularly if they have advanced liver fibrosis, 2) the reduction of the V/F and CL/F of lopinavir as AAG concentrations increase, and 3) the possible complete inhibition of lopinavir CL/F by high concentrations of ritonavir.

As previously described, a one-compartment model with first-

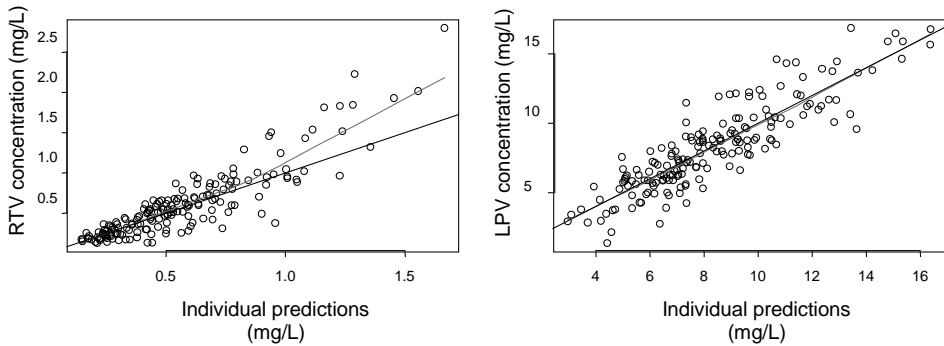


Figure 5. Goodness-of-fit plots of the validation model for ritonavir (RTV; left panel) and lopinavir (LPV; right panel). The grey lines are the smooth curves of the observed concentrations, and the black lines are the lines of identity.

order absorption and elimination described the pharmacokinetics of ritonavir, and the estimates of k_a and V/F were consistent with the values of those studies.^[25-27] However, neither the incorporation of a lag-time nor the inclusion of inter-patient variability in the k_a improved our structural model. This was probably due to the scarce blood sampling during the absorption phase, as this might have precluded its proper characterization. Interestingly, we found that the HCV co-infection, and particularly the presence of advanced liver fibrosis, had a relevant impact on ritonavir CL/F . This value was decreased by nearly half in HIV/HCV co-infected patients with advanced liver

fibrosis compared with HCV negative patients or with HCV co-infected subjects without significant liver fibrosis. This is in agreement with previous results from our group, reporting the influence of HCV co-infection on the pharmacokinetics of lopinavir/ritonavir detected by using non-compartmental methods,^[28] as far as we know, this has not been previously described in any pharmacokinetic model, probably due to the low number of HIV/HCV co-infected patients who were included in other studies.^[25-27] Finally, we were able to estimate an inter-occasion variability of 58% in the fraction of ritonavir absorbed. However, this value should be interpreted cautiously. It

Table 5. Prediction errors for the intermediate and final lopinavir models in the model-validation dataset

	MPE (mg/l)		RMSE (mg/l)	
	Mean	95% CI	Mean	95% CI
Intermediate LPV model	-0.09	(-4.47 , 3.07)	1.80	(0.03 , 4.60)
Final LPV model				
Lopinavir	0.05	(-3.3 , 2.9)	1.45	(0.0, 3.54)
Ritonavir	0.04	(-0.6 , 0.3)	0.21	(0.0 , 0.6)

LPV, lopinavir; CI, confidence interval; MPE, mean prediction error; RMSE, root mean squared error.

may be attributable to the influence of food on the absorption of ritonavir, or it could also reflect inaccuracies in adherence or in the patients' actual dosing time the day before the pharmacokinetic study or their reporting of that time.^[29]

Consistent with previous descriptions of the pharmacokinetics of lopinavir,^[30-32] we developed a one-compartment model with first-order absorption and elimination. Concentrations of AAG were shown to be an important covariate explaining part of the variability estimated for the lopinavir V/F (17%) and CL/F (16%). Lopinavir is known to be highly bound to proteins in plasma, mainly to AAG^[32], and AAG plasma concentrations are elevated in HIV-infected patients.^[33,34] Thus, changes in AAG concentrations may result in changes in the unbound fraction of lopinavir, which is susceptible to be distributed in peripheral tissues or metabolized by the liver. Previous studies have pointed out the relationship between higher AAG concentrations in plasma and lower intracellular disposition or

lower CL/F for several protease inhibitors, included lopinavir.^[36-39]

Other than the influence of demographic and clinical covariates on lopinavir parameters, ritonavir pharmacokinetics must also be considered to adequately describe the time course of lopinavir concentrations. Ritonavir causes reversible inhibition of lopinavir CL/F by the CYP3A4, increasing lopinavir plasma concentrations notably.^[2] Thus, factors affecting ritonavir pharmacokinetics are also likely to influence lopinavir concentrations. In an attempt to incorporate ritonavir exposure as a factor inhibiting lopinavir CL/F the interaction was described as an inverse relationship between individual Bayesian estimates of the ritonavir AUC and lopinavir CL/F.^[30] In our study, ritonavir and lopinavir were modeled simultaneously, considering the interaction between the two drugs to be a direct concentration dependent relationship. This strategy decreased the inter-patient variability in the lopinavir CL/F by 36% and improved model precision compared with the intermediate lopinavir model. The

estimated ritonavir concentration necessary for producing half-inhibition of lopinavir CL/F (IC_{50}) was 0.36 mg/l, which, considering a protein binding of 98-99%, is of the same order of magnitude as in vitro values previously reported.^{[2,}

^{40]} The estimated value of the maximal inhibition of lopinavir clearance by ritonavir suggests that lopinavir metabolism could be completely inhibited at high ritonavir concentrations, suggesting possible lopinavir accumulation. However, the ritonavir concentration needed to attain 99% inhibition of lopinavir CL/F would be above 35 mg/L, which largely exceeds those concentrations observed with ritonavir doses used in clinical practice. However, the usefulness of increasing ritonavir doses to further enhance the exposure to lopinavir may be limited in clinical practice by the appearance of ritonavir-related adverse events. Conversely, it is interesting to note that the ritonavir IC_{50} estimated by our model was far above the ritonavir trough concentrations reported when lopinavir/ritonavir is administered once instead of twice daily.^[42] This could contribute to the higher proportion of patients

with lopinavir concentrations below the proposed minimum effective concentration in patients on once daily lopinavir/ritonavir therapy which has been reported by other authors.^[42, 43]

As mentioned above, the possible misspecification of the absorption phase potentially represented a source of bias in this study, resulting in an overestimation of the variability associated with other parameters in the model or in a higher residual error, which might finally affect the concentration-time profile predicted by the model. However, significant biases were absent in the model validation. Although there was a slight trend to overestimate high ritonavir concentrations, the ritonavir dose used in this combination acts as a booster of lopinavir concentrations and does not have any antiretroviral activity on itself, which makes our final model still appropriate in the clinical setting.

Several studies have assessed the usefulness of lopinavir concentrations in plasma, viral resistance data, or the IQ of lopinavir as predictors of virologic

response in treatment-experienced HIV-infected patients.^[4, 11, 12, 14-17] In these studies, the response to lopinavir/ritonavir therapy was better predicted by lopinavir IQ than by lopinavir concentrations in plasma, pointing to a need to combine information on drug exposure and drug susceptibility for the purpose of predicting virologic response in an individualized fashion.^[14-17] Moreover, once IQ breakpoints for a response to lopinavir/ritonavir therapy are identified, it may be possible to infer the lopinavir target concentration needed to maintain viral suppression in each particular individual. For that purpose, it is crucial to have appropriate tools able to predict lopinavir concentrations achieved with individualized dosing regimens within therapeutic drug monitoring programs. In this regard, population pharmacokinetic models, such as the one developed in the present study, are of great interest.^[44] Following our results, lopinavir/ritonavir dosage could be individualized in each particular patient based on the presence or absence of advanced liver fibrosis in HCV co-infected patients as well as

depending on individual AAG concentrations.

The potential applicability of our model in clinical practice made the validation step of particular importance; in that step, the model appropriately predicted plasma concentrations in a set of patients not included during the model-building step. However, it is noteworthy that the present model was developed and validated for patients receiving lopinavir/ritonavir soft gel capsules. A new lopinavir/ritonavir tablet formulation has recently been licensed for the treatment of HIV-infected patients. With this formulation, lopinavir and ritonavir concentrations rise more rapidly, the lopinavir AUC is about 20% higher, and the influence of food on drug absorption is lower than with the capsules.^[45] Although these differences are slight and both formulations have been demonstrated to be bioequivalent, model refinement in patients receiving lopinavir/ritonavir tablets would be desirable.

In conclusion, a population model to simultaneously describe the

pharmacokinetics of lopinavir and ritonavir was developed and validated in HIV-infected patients. The presence of advanced liver fibrosis influenced the ritonavir CL/F, while AAG concentrations influenced both the lopinavir CL/F and the V/F. The lopinavir CL/F was inhibited by ritonavir concentrations following a maximum effect model. Combining resistance data with Bayesian estimates of the individual parameters of lopinavir and ritonavir could be useful to predict lopinavir exposure and IQ in particular patients and to individualize lopinavir/ritonavir therapy with the aim of maximizing the chances of treatment success.

REFERENCES

1. Walmsley S. Protease inhibitor-based regimens for HIV therapy. Safety and efficacy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45(suppl1):S5-S13.
2. Sham HL, Kempf DL, Molla A, *et al.* ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3218-3224.
3. Hicks C, King MS, Gulick RM, *et al.* Long-term safety and durable antiretroviral activity of lopinavir/ritonavir in treatment-naïve patients: 4 year follow-up study. *AIDS* 2004;18:775-779.
4. Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, *et al.* Analysis of the virological response with respect to baseline viral phenotype and genotype in protease inhibitor-experienced HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir therapy. *Antivir Ther* 2002; 7:165-174.
5. Olson DP, Scadden DT, D'Aquila RT, *et al.* The protease inhibitor ritonavir inhibits the functional activity of the multidrug resistance related-protein 1 (MRP-1). *AIDS* 2002;16:1743-1747.
6. Cooper CL, van Heeswijk RPG, Gallicano K, *et al.* A review of low-dose ritonavir in protease inhibitor combination therapy. *Clin Infect Dis* 2003;36:1585-1592.
7. King JR, Wynn H, Brundage R, *et al.* Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitor therapy. *Clin Pharmacokinet* 2004;43:291-310.

8. Back DJ, Blaschke TF, Boucher CAB, *et al.* Optimising TDM in Clinical Care; a Practical Guide to Performing Therapeutic Drug Monitoring (TDM) for Antiretroviral Agents [online]. Available from URL <http://www.hivpharmacology.com>. [Accessed 2007 November 20].
9. Moltó J, Blanco A, Miranda C, *et al.* Variability in non-nucleoside reverse transcriptase and protease inhibitor concentrations among HIV-infected adults in routine clinical practice. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:560-566.
10. van der Leur MR, Burger DM, la Porte CJL, *et al.* A retrospective TDM database analysis of interpatient variability in the pharmacokinetics of lopinavir in HIV-infected adults. *Ther Drug Monit* 2006;28:650-653.
11. Masquelier B, Breilh D, Neau D, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2926-2932.
12. Boffito M, Arnaudo I, Raiteri R, *et al.* Clinical use of lopinavir/ritonavir in a salvage therapy setting: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *AIDS* 2002;16:2081-2083.
13. Hoefnagel JGM, Koopmans PP, Burger DM, *et al.* Role of the inhibitory quotient in HIV therapy. *Antivir Ther* 2005;10:879-892.
14. Gonzalez de Requena D, Gallego O, Valer L, *et al.* Prediction of virological response to lopinavir/ritonavir using the genotypic inhibitory quotient. *AIDS Research Human Retroviruses* 2004;20:275-278.
15. Castagna A, Gianotti N, Galli L, *et al.* The NIQ of lopinavir is predictive of a 48-week virological response in highly treatment-experienced HIV-1-infected subjects treated with a lopinavir/ritonavir-containing regimen. *Antivir Ther* 2004;9:537-543.
16. Marcelin AG, Cohen-Codar I, King MS, *et al.* Virological and pharmacological parameters

- predicting the response to lopinavir-ritonavir in heavily protease inhibitors-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1720-1726.
17. Hsu A, Isaacson J, Brun S, *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of lopinavir-ritonavir in combination with efavirenz and two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in extensively pretreated human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:350-359.
18. Best BM, Goicoechea M, Witt MD, *et al.* A randomized controlled trial of therapeutic drug monitoring in treatment-naïve and -experienced HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;46:433-442.
19. Kaletra (lopinavir/ritonavir). Prescribing information (USA). North Chicago, IL: Abbott Laboratories (2003).
20. Sterling R, Lissen E, Clumeck N, *et al.* Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006;6:1317-25.
21. Droste JAH, Aarnoutse RE, Koopmans PP, *et al.* Evaluation of antiretroviral drug measurements by an interlaboratory quality control program. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;32:287-291.
22. Beal SL and Sheiner LB. NONMEM Users Guides. Icon Development Solutions, Ellicott City, Maryland, USA, 1989-98.
23. Jonsson EN, Karlsson MO. Xpose: An S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed* 1999;58:51-64.
24. Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokin. Biopharm* 1981;9:503-512.
25. Sale M, Sadler BM, Stein DS. Pharmacokinetic modeling and simulations of interaction of amprenavir and ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:746-754.
26. Lu JF, Blaschke TF, Flexner C, *et al.* Model-based analysis of the pharmaco-

- netic interactions between ritonavir, nelfinavir, and saquinavir after simultaneous and staggered oral administration. *Drug Metab Dispos* 2002;30:1455-1461.
27. Kappelhoff BS, Huitema AD, Crommentuyn KM, *et al.* Development and validation of a population pharmacokinetic model for ritonavir used as a booster or as an antiviral agent in HIV-1-infected patients. *Br J Clin Pharmacol* 2004;59:174-184.
28. Moltó J, Valle M, Blanco A, *et al.* Lopinavir/ritonavir pharmacokinetics in HIV and hepatitis C virus co-infected patients without liver function impairment. Influence of liver fibrosis. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:85-92.
29. Vrijens B, Tousset E, Rode R, *et al.* Successful projection of the time course of drug concentration in plasma during a 1-year period from electronically compiled dosing-time data used as input to individually parametrized pharmacokinetic models. *J Clin Pharmacol* 2005;45:461-467.
30. Dailly E, Gagnieu MC, Allavena C, *et al.* No significant influence of saquinavir hard-gel capsule administration on pharmacokinetics of lopinavir in combination with ritonavir. A population approach. *Ther Drug Monit* 2005;27:782-784.
31. Dailly E, Allavena C, Raffi F, *et al.* Pharmacokinetic evidence of the induction of lopinavir metabolism by efavirenz. *Br J Clin Pharmacol* 2005;60:32-34.
32. Crommentuyn KML, Kappelhoff BS, Mulder JW, *et al.* Population pharmacokinetics of lopinavir in combination with ritonavir in HIV-1-infected patients. *Br J Clin Pharmacol* 2005;60:378-389.
33. Boffito M, Hoggard PG, Lindup WE, *et al.* Lopinavir protein binding in vivo through the 12-hour dosing interval. *Ther Drug Monit* 2004;26:35-39.
34. Merry C, Mulcahy F, Lloyd J, *et al.* Alpha-1-acid glycoprotein concentrations in HIV Disease – Implications for treatment with protease inhibitors. *AIDS* 1996;10(Suppl12):S21.

35. Ollie S, Jacobson MA, Abrams DI. Alpha-1-acid glycoprotein levels in AIDS patients before and after short-term treatment with zidovudine (ZDV). *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993;5:531-533.
36. Jones K, Hoggard PG, Khoo S, et al. Effect of α 1-acid glycoprotein on the intracellular accumulation of the HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir and indinavir in vitro. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:99-102.
37. Holladay JW, Dewey MJ, Michniak BB, et al. Elevated alpha-1-acid glycoprotein reduces the volume of distribution and systemic clearance of saquinavir. *Drug Metab Dispos* 2001;29:299-303.
38. Colombo S, Buclin T, Décosterd LA, et al. Orosomucoid (α 1-acid glycoprotein) plasma concentrations and genetic variants: effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:307-318.
39. Hoggard PG, Owen A. The mechanisms that control intracellular penetration of the HIV protease inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:493-496.
40. Kumar GN, Jayanti VK, Johnson MK, et al. Metabolism and disposition of the HIV-1 protease inhibitor lopinavir (ABT-378) given in combination with ritonavir in rats, dogs, and humans. *Pharm Res* 2004;21:1622-1630.
41. Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, et al. Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol* 2001;75:7462-7469.
42. Eron J, Feinberg J, Kessler HA, et al. Once-daily versus twice-daily lopinavir/ritonavir in antiretroviral-naïve HIV-positive patients: a 48-week randomized clinical trial. *J Infect Dis* 2004;189:265-272.

43. van Heeswijk RPG, Bourbeau M, Seguin I, *et al.* Absence of circadian variation in the pharmacokinetics of lopinavir/ritonavir given as a once daily dosing regimen in HIV-1 infected patients. *Br J Clin Pharmacol* 2005;59:398-404.
44. Barret JS, Labbe L, Pfister M. Application and impact of population pharmacokinetics in the assessment of antiretroviral pharmacotherapy. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:591-625.
45. Klein CE, Chiu YL, Awni W, *et al.* The tablet formulation of lopinavir/ritonavir provides similar bioavailability to the soft-gelatin capsule formulation with less pharmacokinetic variability and diminished food effect. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;44:401-410.

FICHERO CONTROL DEL MODELO FINAL SIMULTÁNEO DE LOPINAVIR Y RITONAVIR

PROB modelo simultaneo final de lopinavir-ritonavir =====

\$INPUT ID TIME TPD CMT AMT DV EVID OCC FIB AGA FCO

\$DATA LPVRTV.prn IGNORE=#

\$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=5

DEFINICIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL MODELO

\$MODEL

COMP=(DEPOT1) ;compartimento dosis LPV

COMP=(DEPOT2) ;compartimento dosis RTV

COMP=(CENTRAL1) ;compartimento obs. LPV

COMP=(CENTRAL2) ;compartimento obs. RTV

\$PK

;definición de variables para variabilidad interocasión

IF(OCC.EQ.1)THEN

OCC1=1

ELSE

OCC1=0

END IF

IF(OCC.EQ.2)THEN

OCC2=1

ELSE

OCC2=0

END IF

IF(OCC.EQ.3)THEN

OCC3=1

ELSE

OCC3=0

END IF

IF(OCC.EQ.4)THEN

OCC4=1

ELSE

OCC4=0

END IF

IF(OCC.EQ.5)THEN

OCC5=1

ELSE

OCC5=0

END IF

```

IF (OCC.EQ.6) THEN
    OCC6=1
ELSE
    OCC6=0
END IF

;##### PARÁMETROS DE RITONAVIR #####

;definición de la var. interocasión en la F de RTV

OCA1=OCC1*ETA(5)
OCA2=OCC2*ETA(6)
OCA3=OCC3*ETA(7)
OCA4=OCC4*ETA(8)
OCA5=OCC5*ETA(9)
OCA6=OCC6*ETA(10)

F2=1*EXP(OCA1+OCA2+OCA3+OCA4+OCA5+OCA6)

;definición del CL/F de RTV

IF (FIB.EQ.3) THEN
TVCLR=THETA(1)*THETA(2) ;pac. con fibr. hep. avanzada
ELSE
TVCLR=THETA(2) ;pac. sin fibr. hep. avanzada
END IF
CLR=TVCLR

;definición del V/F de RTV
TVVR=THETA(3)
VR=TVVR*EXP(ETA(1))

;definición de la ka de RTV
TVKAR=THETA(4)
KAR=TVKAR

;##### PARÁMETROS DE LOPINAVIR #####

;definición del CL/F de LPV: influencia del AGA
FAGA=EXP(-THETA(5)*(AGA-77))
TVCLL=THETA(6)*FAGA
CLL=TVCLL*EXP(ETA(2))

;definición del V/F de LPV: influencia del AGA
FAGVL=EXP(-THETA(7)*(AGA-77))
TVVL=THETA(8)*FAGVL
VL=TVVL*EXP(ETA(3))

;definición de la ka de LPV
TVKAL=THETA(9)
KAL=TVKAL

```

```

;### PARÁMETROS DEL MODELO DE INHIBICIÓN DEL CL/F DE ###
;##### LPV POR RTV #####

;máxima inhibición del CL/F de LPV por RTV
  IMAX=THETA(10)

;concentración de RTV que produce el 50% del IMAX
  TVIC50=THETA(11)

  IC50=TVIC50*EXP(ETA(4))

  S3=VL                      ;factor escalar para CMT3
  S4=VR                      ;factor escalar para CMT4

;## ECUACIONES DIFERENCIALES QUE DEFINEN LA CANTIDAD DE
;FÁRMACO EN CADA UNO DE LOS COMPARTIMENTOS DEL SISTEMA ##

$DES

  CA1=A(1)

  CA2=A(2)
  CA3=A(3)/VL
  CA4=A(4)/VR

  DADT(1)=-KAL*A(1)          ;absorción de LPV
  DADT(2)=-KAR*A(2)          ;absorción de RTV

;curso temporal de la [LPV]: inhib. CL/F de LPV por RTV
  DADT(3)=KAL*A(1)-(((CLL*(1-
(IMAX*CA4)/(IC50+CA4)))/VL)*A(3))

;curso temporal de la [RTV]
  DADT(4)=KAR*A(2)-(CLR/VR)*A(4)

;##### MODELO DE ERROR RESIDUAL #####

$error

IPRED=F

TYP=0                        ;marcador RTV
IF(FCO.EQ.1)TYP=1           ;marcador LPV

IF(FCO.EQ.1)W=1              ;error aditivo para LPV
IF(FCO.EQ.2)W=F              ;error proporcional para RTV

IRES=DV-IPRED
DEL=0
IF(F.EQ.0)DEL=0.00001
IWRES=IRES/(W+DEL)

```

```

Y1=IPRED+W*EPS(1)           ;error LPV
Y2=IPRED+W*EPS(2)           ;error RTV

Y=Y1*TYP+Y2*(1-TYP)

;# ESTIMADOS INICIALES PARÁMETROS POBLACIONALES MEDIOS ##

$THETA

;estimados iniciales parámetros poblacionales medios RTV
(0,0.5)           ;CL/F RTV pac. con fibr. hepática avanzada
(0,19)           ;CL/F RTV pac. sin fibr. hepática avanzada
(0,100)          ;V/F RTV
(0, 0.15)        ;KA RTV

;estimados iniciales parámetros poblacionales medios LPV
(0,0.004)        ;influencia AGA en CL/F LPV
(0, 4)           ;CL/F LPV
(0,0.01)        ;influencia AGA en V/F LPV
(0,90)          ;V/F LPV
0.85 FIX        ;KA LPV

;estimados iniciales modelo inhibición CL/F LPV por RTV

1 FIX           ;IMAX
(0,0.5)        ;IC50

;#### ESTIMADOS INICIALES DE LA IIV DE LOS PARÁMETROS ###
;##### POBLACIONALES MEDIOS #####

$OMEGA
0.7             ;IVV del V/F de RTV
0.1             ;IVV del CL/F de LPV
0.1             ;IVV del V/F de LPV
0.25           ;IVV de la IC50

;### EST. INICIALES IOV DE LA BIODISPONIBILIDAD DE RTV ##

$OMEGA BLOCK(1) 0.3
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) SAME
$OMEGA BLOCK(1) SAME

```

;/# EST. INICIALES DE LOS COMPONENTES DEL ERROR RESIDUAL #

\$SIGMA

3.5 ;error adidtivo LPV

0.11 ;error proporcional RTV

\$EST METHOD=1 INTERACTION NOABORT MAXEVAL=9999 PRINT=1

MSFO=msfb1

\$COV

\$TABLE ID TIME IPRED IRES IWRES FCO ONEHEADER NOPRINT

FILE=sdtabl

DISCUSIÓN

Estudio 1: Variability in Antiretroviral Agents Concentration in Plasma among HIV-Infected Adults in Routine Clinical Practice.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto la existencia de una marcada variabilidad interindividual en la concentración plasmática de los IP e ITINAN entre diferentes individuos infectados por el VIH en el ámbito de la práctica clínica habitual. Además, casi un tercio de los pacientes incluidos presentaban concentraciones de los IP e ITINAN fuera del intervalo terapéutico recomendado.

La presencia de concentraciones subterapéuticas de los antirretrovirales puede comprometer la supresión mantenida de la replicación viral en los pacientes infectados por el VIH, lo que puede aumentar el riesgo de desarrollo de resistencias virales y, finalmente, puede dificultar la reutilización de los fármacos en siguientes esquemas de tratamiento.²²⁹ Por el contrario, concentraciones de los fármacos excesivamente elevadas pueden favorecer la aparición de acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento, lo que puede tener un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes y en la adherencia al tratamiento.^{70, 81, 82, 230} En general, la variabilidad interindividual en la concentración plasmática de los IP e ITINAN fue de aproximadamente un 50% en el presente estudio. Por otro lado, 20 de los 130 pacientes incluidos presentaron una concentración de los fármacos inferior a la concentración mínima efectiva recomendada por un panel internacional de expertos, y un tercio de los pacientes en tratamiento con ITINAN mostraba concentraciones potencialmente tóxicas de los fármacos. Estos resultados sugieren que, a pesar de la existencia de ciertas limitaciones, como la variabilidad intraindividual de la concentración de los fármacos,⁶⁶ la monitorización de la concentración de los antirretrovirales (*therapeutic drug monitoring*, TDM) puede resultar de

ayuda en la práctica clínica para identificar a aquellos pacientes con un mayor riesgo de desarrollar fracaso terapéutico o acontecimientos adversos durante el tratamiento.

La probabilidad de que la concentración de los antirretrovirales estuviera dentro del rango terapéutico fue menor en los pacientes que recibían tratamiento con ITINAN que en los pacientes en tratamiento con IP. No obstante, hay que tener en cuenta que atazanavir e indinavir son los únicos IP para los que se ha propuesto un límite superior en el intervalo terapéutico,^{70, 81, 82} mientras que la mayor parte de los pacientes incluidos en el estudio que recibían IP estaban siendo tratados con lopinavir/ritonavir. De este modo, si tampoco se hubiese considerado un límite superior en el rango terapéutico de los ITINAN, las diferencias observadas en la proporción de pacientes con concentraciones de fármaco adecuadas entre el grupo de pacientes tratados con IP o con ITINAN no habrían sido tan evidentes. Por otra parte, la concentración media de los IP observada en nuestro estudio superó ampliamente la concentración necesaria para inhibir la replicación de las cepas virales *wild-type* del VIH, lo que puede hacer pensar que dicha concentración pudo ser excesiva en una proporción significativa de los pacientes. No obstante, la mayoría de nuestros pacientes ya habían recibido tratamiento con IP con anterioridad, lo que hace posible que hubieran acumulado mutaciones relacionadas con resistencia a los antirretrovirales en el gen de la proteasa. Como resultado, estos pacientes podrían presentar una reducción de la sensibilidad viral a los IP, haciendo necesario alcanzar concentraciones de fármaco más elevadas a las necesarias en pacientes naïve para poder suprimir completamente la replicación del virus.

En general, nuestros resultados están de acuerdo con los comunicados por otros autores. En un estudio llevado a cabo por de Maat *et al*⁸⁶ en el que se incluyeron 1.145 muestras de plasma procedentes de 97 pacientes, la concentración de IP e ITINAN fue subterapéutica en la cuarta parte de las muestras analizadas. En nuestro estudio esta proporción fue discretamente inferior; sin embargo, es importante considerar que en el estudio realizado por de Maat *et al* las concentraciones de los fármacos se determinaron en el contexto de un programa de TDM, y no de forma sistemática, y que la concentración de los fármacos se cuantificó en diferentes ocasiones en una proporción importante de pacientes. Estos dos aspectos podrían haber favorecido la inclusión de pacientes en los que ya existía una sospecha clínica de que la concentración de los fármacos iba a estar fuera del rango terapéutico, lo que finalmente pudo conducir a sobreestimar la prevalencia real de las concentraciones subterapéuticas de los IP e ITINAN. Con el objetivo de evitar estas limitaciones, en nuestro estudio se incluyeron todos los pacientes en tratamiento con IP o ITINAN que acudieron a nuestras consultas durante un periodo representativo de tiempo, y se extrajo una única muestra de plasma por paciente. Por lo tanto, los resultados del presente estudio pueden reflejar de un modo más aproximado la prevalencia global de los pacientes infectados por el VIH que presentan concentraciones de IP o ITINAN fuera del rango terapéutico en la práctica clínica habitual.

Con el fin de que la concentración de los fármacos se determinara tras alcanzar el estado de equilibrio estacionario, en el presente estudio únicamente se incluyeron aquellos pacientes que llevaban recibiendo tratamiento con el fármaco de interés durante al menos cuatro semanas. Sin embargo, excluir a los pacientes que habían interrumpido el tratamiento durante el primer mes de tratamiento

debido a problemas relacionados con la adherencia o con la tolerabilidad al mismo pudo suponer un sesgo de selección. Asumiendo la posibilidad de que los pacientes con una adherencia baja al tratamiento podrían presentar concentraciones de los antirretrovirales inapropiadamente bajas en aquellos y, al contrario, que los pacientes que hubieran desarrollado acontecimientos adversos durante el inicio del tratamiento pudieran tener concentraciones de fármaco excesivamente elevadas, la exclusión de estos sujetos podría habernos llevado a infraestimar la proporción real de los pacientes con concentraciones de IP o ITINAN fuera del rango terapéutico, lo que refuerza la potencial utilidad de la monitorización de la concentración plasmática de los antirretrovirales en la práctica clínica.

La variabilidad en la concentración de los antirretrovirales puede aumentar debido a cambios en la adherencia al tratamiento así como por la existencia interacciones farmacológicas, por lo que estos aspectos siempre deberían considerarse dentro de un programa de TDM. En el presente estudio, la adherencia al tratamiento se evaluó mediante el número de dosis que los pacientes reconocían haber omitido y se registró toda la medicación que los pacientes habían recibido durante la semana previa a la determinación de la concentración de los antirretrovirales. Aunque el método empleado para valorar la adherencia al tratamiento pudo haber supuesto una sobrevaloración de la adherencia real, menos de la mitad de las concentraciones subterapéuticas de IP o ITINAN en este estudio se debieron a problemas relacionados con la adherencia al tratamiento o a la existencia de interacciones farmacológicas. Estos hallazgos sugieren que diferencias individuales en la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos pueden ser responsables

de una parte importante de la variabilidad en las concentraciones de los antirretrovirales.

En conclusión, existe una marcada variabilidad interindividual en la concentración plasmática de los IP e ITINAN en los pacientes infectados por el VIH en la práctica clínica habitual, y una proporción significativa de los mismos presentan concentraciones de fármaco fuera del intervalo terapéutico. Estos resultados, junto con la relativamente menor variabilidad intraindividual en la concentración de los IP e ITINAN previamente descrita,^{77, 83, 100} sugieren que la monitorización terapéutica de la concentración de los antirretrovirales puede resultar de utilidad para guiar el tratamiento antirretroviral en la práctica clínica.

Estudio 2: Lopinavir/Ritonavir Pharmacokinetics in HIV and Hepatitis C Virus Co-Infected Patients without Liver Function Impairment. Influence of Liver Fibrosis.

Los resultados del presente estudio muestran que los parámetros farmacocinéticos de lopinavir no se ven influenciados de un modo significativo por la co-infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en los pacientes infectados por el VIH sin signos de insuficiencia hepática. Sin embargo, a pesar de la ausencia de insuficiencia hepática, los pacientes co-infectados por el VHC pueden presentar un aumento de la concentración plasmática de ritonavir, especialmente cuando presentan un grado avanzado de fibrosis hepática.

La exposición a lopinavir entre los pacientes infectados por el VIH con o sin co-infección por el VHC en ausencia de cirrosis hepática se ha evaluado en dos estudios anteriormente.^{186, 187} Al igual que en nuestro estudio, los autores no encontraron diferencias significativas en la concentración valle de lopinavir entre los pacientes VHC+ y VHC-. Sin embargo, ninguno de ellos evaluó la influencia del grado de la fibrosis hepática en la exposición a lopinavir. En el presente estudio, donde se evaluó un grupo de pacientes infectados por el VIH en ausencia de insuficiencia hepática, ni la co-infección por el VHC por sí misma, ni el grado de fibrosis hepática demostraron tener una influencia significativa en la exposición a lopinavir. Sin embargo, los pacientes co-infectados por el VHC con fibrosis hepática avanzada presentaron un descenso en el aclaramiento de ritonavir de aproximadamente el 40% comparado con los pacientes sin fibrosis hepática, independientemente de si estaban co-infectados por el VHC o no. Estos hallazgos ponen de manifiesto la mayor relevancia del grado de la fibrosis hepática que la de la co-infección por el VHC de forma aislada en la actividad del citocromo P450 y en la posible

acumulación de los fármacos, incluso en ausencia de disfunción hepática clínicamente evidente.

La co-infección por el VHC constituye un factor de riesgo conocido para desarrollar hepatotoxicidad tras el inicio del tratamiento con lopinavir/ritonavir en los pacientes infectados por el VIH.^{186, 187, 231-235}

Sin embargo, los mecanismos responsables de esta mayor toxicidad continúan siendo controvertidos, y el correlato entre hallazgos histológicos como la fibrosis hepática, la exposición a los fármacos y el desarrollo de la toxicidad hepática sigue siendo meramente una hipótesis. Aranzabal *et al*²³⁶ evaluaron la influencia del grado de fibrosis hepática en el desarrollo de hepatotoxicidad en los pacientes infectados por el VIH que iniciaban tratamiento antirretroviral. En dicho estudio, el riesgo relativo de presentar toxicidad hepática fue tres veces superior en los pacientes con fibrosis hepática avanzada comparado con los pacientes que sólo presentaban un grado de fibrosis hepática leve o moderado. Sin embargo, los autores no determinaron la concentración de los antirretrovirales. Por otra parte, dos estudios diferentes han evaluado la relación entre la exposición a lopinavir y las elevaciones de los enzimas hepáticos en pacientes no cirróticos infectados por el VIH en tratamiento con lopinavir/ritonavir.^{186, 187} Aunque en ninguno de ellos se observó una relación entre la concentración valle de lopinavir y el desarrollo de toxicidad hepática severa, los autores sólo determinaron las concentraciones plasmáticas de lopinavir, sin tener en consideración la concentración de ritonavir. Nosotros hemos observado un aumento en la exposición a ritonavir pero no a lopinavir en los pacientes co-infectados por el VIH y el VHC en presencia de fibrosis hepática avanzada en el presente estudio. En base a estos resultados, podría hipotetizarse que el mayor riesgo de toxicidad hepática descrito en los pacientes co-infectados por el VIH y el VHC con fibrosis hepática

avanzada que reciben tratamiento con lopinavir/ritonavir podría ser debido a una mayor exposición a ritonavir, pero no a lopinavir. No obstante, nuestro estudio presenta dos limitaciones que no permiten extraer conclusiones firmes en este sentido. En primer lugar, su diseño transversal y, por otra parte, que los pacientes tenían que encontrarse recibiendo tratamiento estable con lopinavir/ritonavir durante al menos cuatro semanas para ser incluidos en el estudio. Como consecuencia, es posible que pacientes que hubieran iniciado tratamiento con lopinavir/ritonavir y que lo hubieran interrumpido prematuramente (antes de llevar 4 semanas en tratamiento) por motivos de toxicidad (posiblemente secundaria a concentraciones de fármaco elevadas) no hubieran sido incluidos en el estudio, lo que puede suponer un sesgo de selección a la hora de explorar la posible relación entre la exposición a los fármacos y el desarrollo de toxicidad.

El volumen de distribución de lopinavir fue el otro parámetro farmacocinético que se vio modificado por el grado de fibrosis hepática. Los pacientes co-infectados por el VIH y el VHC que presentaban fibrosis hepática avanzada tenían un volumen de distribución de lopinavir significativamente superior al de los pacientes co-infectados sin fibrosis hepática o al de los pacientes no co-infectados por el VHC. Como es conocido, lopinavir se une extensamente a la albúmina y a la α_1 -glicoproteína ácida, ambas de síntesis hepática.^{172, 176} Por tanto, el mayor volumen de distribución observado en nuestro estudio en los pacientes co-infectados con fibrosis hepática avanzada podría ser debido a que estos pacientes tenían una menor concentración de albúmina en plasma que los pacientes co-infectados sin fibrosis hepática o que los no co-infectados por el VHC (aunque sólo las diferencias entre los pacientes co-infectados con fibrosis avanzada y los no co-infectados alcanzaron

la significación estadística). Estos resultados concuerdan con los descritos por Peng *et al*¹⁸⁸ en pacientes con insuficiencia hepática leve o moderada, quién además observó una disminución de la fijación del lopinavir a las proteínas plasmáticas en este escenario.

Somos conscientes de que la biopsia hepática sigue siendo el método de referencia para valorar la severidad de la hepatopatía en los pacientes infectados por el VHC. Sin embargo, esta técnica no está exenta de riesgos y, además, su resultado puede no ser representativo del parénquima hepático en hasta un 20% de los casos.²³⁷ Como resultado, distintos marcadores capaces de predecir el grado de daño histológico del parénquima hepático de un modo no invasivo están ganando una creciente popularidad.²³⁸⁻²⁴² El índice FIB-4 es un sistema de puntuación simple que fue desarrollado y validado en dos grupos independientes de pacientes co-infectados por el VIH y el VHC que participaron en el estudio APRICOTT y de los que se disponía de una biopsia hepática.²⁴¹ Este índice tiene las ventajas de poder ser calculado con datos analíticos usados en la práctica clínica, por lo que puede ser fácilmente incorporado a la rutina habitual, y de presentar una buena correlación con los hallazgos histológicos. En este sentido, el valor predictivo negativo de presentar fibrosis hepática avanzada cuando el FIB-4 es $\leq 1,42$ es del 90%. Igualmente, el valor predictivo positivo de presentar fibrosis hepática avanzada cuando el FIB-4 es $\geq 3,25$ es del 65%. Este relativamente bajo valor predictivo positivo cuando el FIB-4 es $\geq 3,25$ hace posible que pacientes con grados menos severos de fibrosis hepática pudieran haber sido clasificados erróneamente como pacientes con fibrosis hepática avanzada, lo que finalmente podría haber resultado en una infravaloración de la influencia de la fibrosis hepática en la exposición a los fármacos en el presente estudio. Por otra parte, el grado de fibrosis hepática es menos predecible cuando

el FIB-4 toma valores entre 1,42 a 3,25. Con el fin de superar esta limitación, los pacientes que presentaban valores de FIB-4 entre 1,42 y 3,25 no se incluyeron en el análisis sobre la influencia del grado de fibrosis hepática en los parámetros farmacocinéticos de lopinavir o ritonavir, lo que redujo la potencia estadística para detectar diferencias significativas en la exposición a los fármacos entre los pacientes con o sin fibrosis hepática avanzada. Por último, la elastografía hepática constituye otro método no invasivo para determinar el grado de fibrosis hepática en los pacientes co-infectados por el VIH y el VHC.²⁴³ Aunque la elastografía ha demostrado tener una mejor relación con el grado de fibrosis hepática que otros índices no invasivos, incluido el FIB4, el acceso a esta prueba en el momento en el que este estudio fue realizado era muy limitado, por lo que no pudo emplearse para valorar el grado de fibrosis hepática en nuestros pacientes.

En conclusión, la exposición a lopinavir no aumentó en los pacientes co-infectados por el VIH y el VHC en ausencia de insuficiencia hepática. Sin embargo, la exposición a ritonavir puede aumentar en este contexto, especialmente en los pacientes que presentan un grado avanzado de fibrosis hepática.

Estudio 3: Simultaneous Population Pharmacokinetic Model for Lopinavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults.

En el presente estudio se ha desarrollado un modelo farmacocinético poblacional para lopinavir y ritonavir que incorpora la relación existente entre la concentración plasmática de ritonavir y el aclaramiento de lopinavir. Los principales resultados del estudio son los siguientes: 1) el aclaramiento de ritonavir está disminuido en los pacientes co-infectados por el VHC, especialmente en presencia de fibrosis hepática avanzada, 2) el volumen de distribución y el aclaramiento de lopinavir disminuyen con el aumento de la concentración plasmática de α 1-glicoproteína ácida, y 3) se puede inhibir por completo el aclaramiento de lopinavir al incrementar la concentración de ritonavir.

De modo similar a lo comunicado en otros estudios, la farmacocinética de ritonavir se ha descrito mediante un modelo monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden, siendo los estimados de k_a y V/F consistentes con los valores previamente comunicados por otros autores.^{182, 244, 245} Sin embargo, ni la incorporación de un tiempo de latencia en la absorción ni la inclusión de variabilidad interindividual en la k_a mejoraron nuestro modelo estructural, probablemente debido a un muestreo insuficiente durante la fase de absorción del fármaco que permitiera caracterizar dicha fase de forma apropiada. Por otra parte, la co-infección por el VHC, y en especial la presencia de fibrosis hepática avanzada, tuvieron un impacto relevante en el aclaramiento de ritonavir. Así, este parámetro se redujo hasta casi la mitad en los pacientes co-infectados por el VIH/VHC que presentaban fibrosis hepática avanzada, comparado con los pacientes VHC negativos o con los co-infectados por VHC pero sin fibrosis hepática. Esta observación

concuenda con resultados previos comunicados por nuestro grupo en los que se describía la influencia de la co-infección por el VHC en la farmacocinética de lopinavir/ritonavir evaluada mediante métodos de análisis no compartimental²⁴⁶ y, aunque no ha sido previamente establecida en ningún modelo farmacocinético de ritonavir,^{182, 244, 245} probablemente ello es debido al escaso número de pacientes co-infectados por el VHC incluidos en dichos estudios. Por ultimo, en nuestro estudio se obtuvo un estimado de la variabilidad interocasión en la biodisponibilidad de ritonavir de un 58%, lo que debe de ser interpretado cuidadosamente ya que se podría atribuir a la influencia de los alimentos en la absorción del ritonavir, pero también podría reflejar inexactitudes en la adherencia al tratamiento o en el tiempo de la última dosis el día previo al estudio farmacocinético.²⁴⁷

De acuerdo con descripciones anteriores de la farmacocinética de lopinavir,^{169, 170, 248} hemos desarrollado un modelo monocompartimental con una absorción y una eliminación de primer orden para describir el curso temporal de la concentración plasmática de lopinavir. En este modelo, la concentración de α 1-glicoproteína ácida demostró ser una covariable importante que explicaba una parte de la variabilidad estimada en el volumen de distribución (17%) y en el aclaramiento (16%) de lopinavir. Lopinavir es un fármaco con una extensa unión a las proteínas plasmáticas, principalmente a la α 1-glicoproteína,¹⁷⁶ por ello, cambios en la concentración de α 1-glicoproteína ácida pueden resultar en cambios en la fracción libre de lopinavir que es susceptible de distribuirse a los tejidos periféricos o de ser metabolizada por el hígado. Estudios previos han señalado la existencia de una relación inversa entre la concentración de α 1-glicoproteína ácida en plasma y la concentración intracelular o el aclaramiento de varios fármacos inhibidores de la proteasa, incluido el lopinavir.²⁴⁹⁻²⁵²

Con el propósito de describir adecuadamente el curso temporal de la concentración de lopinavir, además de la influencia de determinadas covariables demográficas y clínicas, es necesario considerar la farmacocinética de ritonavir. Ritonavir causa una inhibición reversible del aclaramiento de lopinavir por el isoenzima CYP3A4 del citocromo P450, aumentando notablemente la exposición al lopinavir.¹⁶⁸ Por ello, factores que afecten a la farmacocinética del ritonavir pueden también influir en la concentración de lopinavir. Así, en un intento de incorporar la exposición a ritonavir como un factor inhibidor del aclaramiento de lopinavir, Crommentyum *et al*¹⁷⁰ describieron dicha interacción como una relación inversa entre los estimados bayesianos individuales del área bajo la curva de ritonavir y el aclaramiento de lopinavir. En nuestro modelo final, ritonavir y lopinavir se modelaron simultáneamente, considerando la interacción entre los dos fármacos como un fenómeno directamente dependiente de la concentración de ritonavir. Esta estrategia disminuyó la variabilidad interindividual del aclaramiento de lopinavir un 36% y mejoró la precisión de la predicción de las concentraciones individuales de lopinavir respecto a un modelo intermedio que relacionaba el aclaramiento de lopinavir con el área bajo la curva de ritonavir. La concentración de ritonavir necesaria para inhibir el 50% del aclaramiento de lopinavir estimada en el presente trabajo fue de 0.36 mg/L, lo que, considerando una tasa de unión a las proteínas plasmáticas del 98-99%, está en el mismo orden de magnitud que los valores previamente descritos en experimentos llevados a cabo *in vitro* con microsomas humanos.^{168,}¹⁸¹ Además el valor máximo estimado de la inhibición del aclaramiento de lopinavir por ritonavir sugiere que el metabolismo de lopinavir podría ser completamente inhibido por concentraciones elevadas de ritonavir, conduciendo a una acumulación de lopinavir. Sin embargo, la concentración de ritonavir necesaria para inhibir el 99% del metabolismo de lopinavir se situaría por encima de 35 mg/L, lo que

resulta muy superior a las concentraciones de ritonavir habitualmente observadas en la práctica clínica. Por ello, la utilidad de aumentar las dosis de ritonavir para aumentar aún más la exposición a lopinavir se ve limitada por la aparición de acontecimiento adversos.

Como se ha mencionado anteriormente, la escasez del muestreo durante la fase de absorción de lopinavir/ritonavir podría suponer un sesgo para el modelo que podría llevar a sobre-estimar la variabilidad asociada a los parámetros del modelo o a un error residual superior al existente en la realidad, lo que finamente afectaría a la concentración predicha por el modelo. Sin embargo, no se apreciaron sesgos significativos en la validación del modelo, lo que hace improbable la hipótesis anterior.

Distintos estudios han evaluado la utilidad de monitorizar la concentración plasmática de lopinavir, de los datos de la resistencia viral o del cociente inhibitorio de lopinavir como factores predictores de la respuesta virológica al tratamiento antirretroviral en pacientes infectados por el VIH con experiencia antirretroviral previa.^{75, 118-121, 225,}

²²⁷ En dichos estudios, el cociente inhibitorio de lopinavir predijo la respuesta al tratamiento con lopinavir/ritonavir mejor que la concentración plasmática de lopinavir considerada aisladamente, poniendo de manifiesto la necesidad de combinar información farmacológica junto con información acerca de la sensibilidad viral a los fármacos para poder predecir la respuesta virológica al tratamiento de un modo individualizado.¹¹⁸⁻¹²¹ Es más, una vez descritos los valores del cociente inhibitorio de lopinavir que predicen una respuesta favorable al tratamiento con lopinavir/ritonavir de un modo fiable, sería posible inferir la concentración plasmática de lopinavir necesaria para mantener la supresión de la replicación viral en cada paciente en particular. Para tal fin, es crucial poder disponer

de las herramientas adecuadas, capaces de predecir de un modo fiable la concentración de lopinavir que alcanzaría un individuo en concreto con un esquema posológico individualizado. En este sentido, los modelos farmacocinéticos poblacionales, como el desarrollado en el presente estudio, resultan de gran interés.²⁵³ Según nuestros resultados, la dosis de lopinavir/ritonavir podría individualizarse en cada paciente en particular basándose en la presencia o ausencia de fibrosis hepática avanzada en los pacientes co-infectados por el VHC así como dependiendo de la concentración individual de α 1-glicoproteína ácida.

La potencial aplicabilidad de nuestro modelo a la práctica clínica hizo que la validación del mismo fuera de especial importancia. El modelo predijo adecuadamente la concentración de lopinavir en un grupo de pacientes cuya información no había sido considerada durante el proceso de desarrollo del mismo, lo que aporta consistencia a nuestros resultados. No obstante, es importante tener en cuenta que el presente modelo fue desarrollado y validado en pacientes que recibían tratamiento con la formulación en cápsulas blandas de lopinavir/ritonavir y que recientemente se ha aprobado una nueva formulación de lopinavir/ritonavir en comprimidos. Con esta nueva formulación, la absorción de lopinavir y ritonavir es más rápida, el área bajo la curva de lopinavir es un 20% mayor, y la influencia de los alimentos en la absorción es menor que con las cápsulas.¹⁷³ Así, aunque estas diferencias parecen ser leves y ambas formulaciones han demostrado ser bioequivalentes, sería deseable reajustar el presente modelo en pacientes en tratamiento con la nueva formulación en comprimidos de lopinavir/ritonavir.

En resumen, hemos desarrollado y validado un modelo farmacocinético poblacional para describir simultáneamente la

concentración de lopinavir y de ritonavir. La presencia de fibrosis hepática avanzada influyó en el aclaramiento de ritonavir, mientras que la concentración plasmática de α 1-glicoproteína ácida modificó el aclaramiento y el volumen de distribución de lopinavir. La concentración de ritonavir inhibió el aclaramiento de lopinavir siguiendo un modelo de efecto máximo. Combinar los datos de resistencia viral con los estimados bayesianos de los parámetros individuales de lopinavir y ritonavir podría ser de gran utilidad para predecir la exposición a lopinavir y el cociente inhibitorio en cada paciente en particular y, así, individualizar el tratamiento con lopinavir/ritonavir con el objeto de maximizar las probabilidades de éxito terapéutico.

CONCLUSIONES

Las conclusiones alcanzadas en los trabajos que configuran la presente tesis doctoral son las siguientes:

Estudio 1: Variability in Antiretroviral Agents Concentration in Plasma among HIV-Infected Adults in Routine Clinical Practice.

Existe una marcada variabilidad interindividual en la concentración plasmática de los IP e ITINAN en los pacientes adultos infectados por el VIH en la práctica clínica habitual.

Una proporción significativa de los pacientes infectados por el VIH en la práctica clínica habitual presenta concentraciones de fármaco fuera del intervalo terapéutico propuesto.

La monitorización terapéutica de la concentración de los antirretrovirales puede resultar de utilidad para guiar el tratamiento antirretroviral en la práctica clínica.

Estudio 2: Lopinavir/Ritonavir Pharmacokinetics in HIV and Hepatitis C Virus Co-Infected Patients without Liver Function Impairment. Influence of Liver Fibrosis.

Los parámetros farmacocinéticos de lopinavir no se ven influenciados de un modo significativo por la co-infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en los pacientes infectados por el VIH sin signos de insuficiencia hepática.

Los pacientes co-infectados por el VHC pueden presentar un aumento de la concentración plasmática de ritonavir a pesar de la ausencia de insuficiencia hepática, especialmente cuando presentan un grado avanzado de fibrosis hepática.

Estudio 3: **Simultaneous Population Pharmacokinetic Model for Lopinavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults.**

Se ha desarrollado un modelo farmacocinético poblacional para lopinavir y ritonavir que incorpora la relación existente entre la concentración plasmática de ritonavir y el aclaramiento de lopinavir.

Según los resultados observados:

- El aclaramiento de ritonavir está disminuido en los pacientes co-infectados por el VHC, especialmente en presencia de fibrosis hepática avanzada.
- El volumen de distribución y el aclaramiento de lopinavir disminuyen con el aumento de la concentración plasmática de α 1-glicoproteína ácida.
- Mediante el incremento de la concentración de ritonavir podría llegar a inhibirse por completo el aclaramiento de lopinavir

BIBLIOGRAFÍA

1. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998 Mar 26;338(13):853-60.
2. Ministerio de Sanidad y Consumo SdPNseS, Vigilancia Epidemiológica del Sida en España. Registro Nacional de Casos de Sida. Actualización a 30 de Junio de 2005.
3. Bartlett J, Fath M, DeMasi R, Quinn J, Hermes A, Rousseau F. An updated systematic overview of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-infected adults. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2005. Abstract 586.
4. van Heeswijk RP, Veldkamp A, Mulder JW, Meenhorst PL, Lange JM, Beijnen JH, *et al.* Combination of protease inhibitors for the treatment of HIV-1-infected patients: a review of pharmacokinetics and clinical experience. *Antivir Ther.* 2001 Dec;6(4):201-29.
5. Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, Squier C, *et al.* Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med.* 2000 Jul 4;133(1):21-30.
6. Miller V, Cozzi-Lepri A, Hertogs K, Gute P, Larder B, Bloor S, *et al.* HIV drug susceptibility and treatment response to mega-

- HAART regimen in patients from the Frankfurt HIV cohort. *Antivir Ther.* 2000 Mar;5(1):49-55.
7. Chesney MA, Ickovics J, Hecht FM, Sikipa G, Rabkin J. Adherence: a necessity for successful HIV combination therapy. *AIDS.* 1999;13 Suppl A:S271-8.
 8. Haubrich RH, Little SJ, Currier JS, Forthal DN, Kemper CA, Beall GN, *et al.* The value of patient-reported adherence to antiretroviral therapy in predicting virologic and immunologic response. California Collaborative Treatment Group. *AIDS.* 1999 Jun 18;13(9):1099-107.
 9. Arnsten JH, Demas PA, Farzadegan H, Grant RW, Gourevitch MN, Chang CJ, *et al.* Antiretroviral therapy adherence and viral suppression in HIV-infected drug users: comparison of self-report and electronic monitoring. *Clin Infect Dis.* 2001 Oct 15;33(8):1417-23.
 10. Bangsberg DR, Perry S, Charlebois ED, Clark RA, Roberston M, Zolopa AR, *et al.* Non-adherence to highly active antiretroviral therapy predicts progression to AIDS. *AIDS.* 2001 Jun 15;15(9):1181-3.
 11. Garcia de Olalla P, Knobel H, Carmona A, Guelar A, Lopez-Colomes JL, Cayla JA. Impact of adherence and highly active antiretroviral therapy on survival in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002 May 1;30(1):105-10.
 12. Hogg RS, Heath K, Bangsberg D, Yip B, Press N, O'Shaughnessy MV, *et al.* Intermittent use of triple-

- combination therapy is predictive of mortality at baseline and after 1 year of follow-up. *AIDS*. 2002 May 3;16(7):1051-8.
13. Grimes R, Easling I, Shahjahan M, Ray S, Rossen R, Miller S. Nonadherence to protease inhibitors in 758 patients from three separate cohorts of HIV infected patients. 13th International AIDS Conference. Durban, 2000. Abstract ThPeB4983.
 14. Paech V, Lorenzen T, Stoehr A, Plettenberg A. Adherence to HAART: why is it so difficult? *Arch Intern Med*. 2002 May 27;162(10):1197.
 15. Nieuwkerk PT, Sprangers MA, Burger DM, Hoetelmans RM, Hugen PW, Danner SA, *et al*. Limited patient adherence to highly active antiretroviral therapy for HIV-1 infection in an observational cohort study. *Arch Intern Med*. 2001 Sep 10;161(16):1962-8.
 16. Weiser S, Wolfe W, Bangsberg D, Thior I, Gilbert P, Makhema J, *et al*. Barriers to antiretroviral adherence for patients living with HIV infection and AIDS in Botswana. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Nov 1;34(3):281-8.
 17. Mannerheimer S, Friedland G, Matts J. Self-reported antiretroviral adherence correlates with HIV viral load and declines over time. 13th International AIDS Conference. Durban, 2000. Abstract TuOrB421.
 18. Liu H, Golin CE, Miller LG, Hays RD, Beck CK, Sanandaji S, *et al*. A comparison study of multiple measures of adherence

- to HIV protease inhibitors. *Ann Intern Med.* 2001 May 15;134(10):968-77.
19. Glass TR, De Geest S, Weber R, Vernazza PL, Rickenbach M, Furrer H, *et al.* Correlates of self-reported nonadherence to antiretroviral therapy in HIV-infected patients: the Swiss HIV Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006 Mar;41(3):385-92.
20. Claxton AJ, Cramer J, Pierce C. A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance. *Clin Ther.* 2001 Aug;23(8):1296-310.
21. d'Arminio Monforte A, Lepri AC, Rezza G, Pezzotti P, Antinori A, Phillips AN, *et al.* Insights into the reasons for discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy (HAART) regimen in a cohort of antiretroviral naive patients. I.CO.N.A. Study Group. Italian Cohort of Antiretroviral-Naive Patients. *AIDS.* 2000 Mar 31;14(5):499-507.
22. Moyle G. The Assessing Patients' Preferred Treatments (APPT-1) study. *Int J STD AIDS.* 2003 Oct;14 Suppl 1:34-6.
23. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* 1996 Mar 15;271(5255):1582-6.
24. Mansky LM. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J Gen Virol.* 1998 Jun;79 (Pt 6):1337-45.

25. Gonzalez de Requena D, Bonora S, Garazzino S, Sciandra M, d'Avolio A, Raiteri R, *et al.* Nevirapine plasma exposure affects both durability of viral suppression and selection of nevirapine primary resistance mutations in a clinical setting. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3966-9.
26. Sethi AK, Celentano DD, Gange SJ, Moore RD, Gallant JE. Association between adherence to antiretroviral therapy and human immunodeficiency virus drug resistance. *Clin Infect Dis.* 2003 Oct 15;37(8):1112-8.
27. Bangsberg DR, Porco TC, Kagay C, Charlebois ED, Deeks SG, Guzman D, *et al.* Modeling the HIV protease inhibitor adherence-resistance curve by use of empirically derived estimates. *J Infect Dis.* 2004 Jul 1;190(1):162-5.
28. Bangsberg DR, Charlebois ED, Grant RM, Holodniy M, Deeks SG, Perry S, *et al.* High levels of adherence do not prevent accumulation of HIV drug resistance mutations. *AIDS.* 2003 Sep 5;17(13):1925-32.
29. Bangsberg DR, Moss AR, Deeks SG. Paradoxes of adherence and drug resistance to HIV antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2004 May;53(5):696-9.
30. King MS, Brun SC, Kempf DJ. Relationship between adherence and the development of resistance in antiretroviral-naive, HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir or nelfinavir. *J Infect Dis.* 2005 Jun 15;191(12):2046-52.
31. Napravnik S, Edwards D, Stewart P, Stalzer B, Matteson E, Eron JJ, Jr. HIV-1 drug resistance evolution among patients

- on potent combination antiretroviral therapy with detectable viremia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 Sep 1;40(1):34-40.
32. Kavlick MF, Shirasaka T, Kojima E, Pluda JM, Hui F, Jr., Yarchoan R, *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolated from patients receiving (–)-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antiviral Res.* 1995 Oct;28(2):133-46.
33. Bachelier L, Jeffrey S, Hanna G, D'Aquila R, Wallace L, Logue K, *et al.* Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J Virol.* 2001 Jun;75(11):4999-5008.
34. Srinivas RV, Fridland A. Antiviral activities of 9-R-2-phosphonomethoxypropyl adenine (PMPA) and bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA against various drug-resistant human immunodeficiency virus strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jun;42(6):1484-7.
35. Youle M. Overview of boosted protease inhibitors in treatment-experienced HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:1195-205.
36. Fox Z, Dragsted UB, Gerstoft J, Phillips AN, Kjaer J, Mathiesen L, *et al.* A randomized trial to evaluate continuation versus discontinuation of lamivudine in individuals failing a lamivudine-containing regimen: the COLATE trial. *Antivir Ther.* 2006;11(6):761-70.

37. Castagna A, Danise A, Menzo S, Galli L, Gianotti N, Carini E, *et al.* Lamivudine monotherapy in HIV-1-infected patients harbouring a lamivudine-resistant virus: a randomized pilot study (E-184V study). *AIDS*. 2006 Apr 4;20(6):795-803.
38. Nelson M, Arasteh K, Clotet B, Cooper DA, Henry K, Katlama C, *et al.* Durable efficacy of enfuvirtide over 48 weeks in heavily treatment-experienced HIV-1-infected patients in the T-20 versus optimized background regimen only 1 and 2 clinical trials. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Dec 1;40(4):404-12.
39. Hicks CB, Cahn P, Cooper DA, Walmsley SL, Katlama C, Clotet B, *et al.* Durable efficacy of tipranavir-ritonavir in combination with an optimised background regimen of antiretroviral drugs for treatment-experienced HIV-1-infected patients at 48 weeks in the Randomized Evaluation of Strategic Intervention in multi-drug reSistant patients with Tipranavir (RESIST) studies: an analysis of combined data from two randomised open-label trials. *Lancet*. 2006 Aug 5;368(9534):466-75.
40. Clotet B, Bellos N, Molina JM, Cooper D, Goffard JC, Lazzarin A, *et al.* Efficacy and safety of darunavir-ritonavir at week 48 in treatment-experienced patients with HIV-1 infection in POWER 1 and 2: a pooled subgroup analysis of data from two randomised trials. *Lancet*. 2007 Apr 7;369(9568):1169-78.
41. Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, Gatell JM, Lazzarin A, Vittecoq D, *et al.* Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced

- patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet*. 2007 Apr 14;369(9569):1261-9.
42. Lazzarin A, Campbell T, Clotet B, Johnson M, Katlama C, Moll A, *et al.* Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-2: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2007 Jul 7;370(9581):39-48.
 43. Madruga JV, Cahn P, Grinsztejn B, Haubrich R, Lalezari J, Mills A, *et al.* Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2007 Jul 7;370(9581):29-38.
 44. Lalezari J, Goodrich J, DeJesus E, Lampiris H, Gulick R, Saag M, *et al.* Efficacy and safety of maraviroc plus optimized background therapy in viremic ART-experienced patients infected with CCR5-tropic HIV-1: 24 week results from a phase 2b/3 study in the US and Canada. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Los Angeles, 2007. Abstract 104bLB.
 45. Nelson M, Fätkenheuer G, Konourina I, Lazzarin A, Clumeck N, Horban A, *et al.* Efficacy and Safety of Maraviroc plus Optimized Background Therapy in Viremic, ART-experienced Patients Infected with CCR5-tropic HIV-1 in Europe, Australia, and North America: 24-Week Results. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Los Angeles, 2007. Abstract 104aLB.

46. Morand-Joubert L, Charpentier C, Poizat G, Chene G, Dam E, Raguin G, *et al.* Low genetic barrier to large increases in HIV-1 cross-resistance to protease inhibitors during salvage therapy. *Antivir Ther.* 2006;11(2):143-54.
47. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, *et al.* Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis.* 2003 Jul 1;37(1):113-28.
48. Richman DD. Benefits and limitations of testing for resistance to HIV drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Apr;53(4):555-7.
49. Shafer RW, Jung DR, Betts BJ. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease mutation search engine for queries. *Nat Med.* 2000 Nov;6(11):1290-2.
50. Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):298-303.
51. Van Laethem K, De Luca A, Antinori A, Cingolani A, Perna CF, Vandamme AM. A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients. *Antivir Ther.* 2002 Jun;7(2):123-9.

52. Leitner T, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors J, *et al.* HIV Sequence Compendium. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos: Laboratory LAN; 2004.
53. Menendez-Arias L. Sensitivity to reverse transcriptase and protease inhibitors of recombinant HIV clones harboring resistance mutations: *in vitro* studies. En: Clotet B, *et al.* Guide to Management of HIV Drug Resistance, Antiretroviral Pharmacokinetics and Viral Hepatitis in HIV Infected Subjects. 7^a ed. Barcelona: Editorial Fund. Lluita contra la Sida; 2007. p. 133-292.
54. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, *et al.* Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2007. Top HIV Med. 2007 Aug-Sep;15(4):119-25.
55. Larder B, De Vroey V, Dehertogh P, Kemp S, Bloor S, Hertogs K. Predicting HIV-1 phenotypic resistance from genotype using a large phenotype-genotype relational database. Antiviral Therapy. 1999;4 (Suppl.1):41.
56. Clevenbergh P, Durant J, Halfon P, del Giudice P, Mondain V, Montagne N, *et al.* Persisting long-term benefit of genotype-guided treatment for HIV-infected patients failing HAART. The Viradapt Study: week 48 follow-up. Antivir Ther. 2000 Mar;5(1):65-70.
57. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, *et al.* A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral

- resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. AIDS. 2000 Jun 16;14(9):F83-93.
58. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, *et al.* Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. AIDS. 2002 Jan 25;16(2):209-18.
59. Cohen CJ, Hunt S, Sension M, Farthing C, Conant M, Jacobson S, *et al.* A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. AIDS. 2002 Mar 8;16(4):579-88.
60. Vray M, Meynard JL, Dalban C, Morand-Joubert L, Clavel F, Brun-Vezinet F, *et al.* Predictors of the virological response to a change in the antiretroviral treatment regimen in HIV-1-infected patients enrolled in a randomized trial comparing genotyping, phenotyping and standard of care (Narval trial, ANRS 088). Antivir Ther. 2003 Oct;8(5):427-34.
61. Wegner SA, Wallace MR, Aronson NE, Tasker SA, Blazes DL, Tamminga C, *et al.* Long-term efficacy of routine access to antiretroviral-resistance testing in HIV type 1-infected patients: results of the clinical efficacy of resistance testing trial. Clin Infect Dis. 2004 Mar 1;38(5):723-30.
62. Perez-Elias MJ, Garcia-Arota I, Munoz V, Santos I, Sanz J, Abaira V, *et al.* Phenotype or virtual phenotype for choosing antiretroviral therapy after failure: a prospective, randomized study. Antivir Ther. 2003 Dec;8(6):577-84.

63. Mazzotta F, Lo Caputo S, Torti C, Tinelli C, Pierotti P, Castelli F, *et al.* Real versus virtual phenotype to guide treatment in heavily pretreated patients: 48-week follow-up of the Genotipo-Fenotipo di Resistenza (GenPheRex) trial. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Mar 1;32(3):268-80.
64. Panel de expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el Sida. Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (actualización Enero 2007). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* ed; 2007. p. 32-53.
65. Bartlett J, Clifford Lane H and the DHHS Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. [Último acceso Abril 2008].
66. Back D, Gatti G, Fletcher C, Garaffo R, Haubrich R, Hoetelmans R, *et al.* Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions. *AIDS.* 2002 Mar;16 Suppl 1:S5-37.
67. Durant J, Clevenbergh P, Garraffo R, Halfon P, Icard S, Del Giudice P, *et al.* Importance of protease inhibitor plasma levels in HIV-infected patients treated with genotypic-guided therapy: pharmacological data from the Viradapt Study. *AIDS.* 2000 Jul 7;14(10):1333-9.

68. Drusano GL, Bilello JA, Stein DS, Nessly M, Meibohm A, Emini EA, *et al.* Factors influencing the emergence of resistance to indinavir: role of virologic, immunologic, and pharmacologic variables. *J Infect Dis.* 1998 Aug;178(2):360-7.
69. Reijers MH, Weigel HM, Hart AA, Ten Kate RW, Mulder JW, Reiss P, *et al.* Toxicity and drug exposure in a quadruple drug regimen in HIV-1 infected patients participating in the ADAM study. *AIDS.* 2000 Jan 7;14(1):59-67.
70. Dieleman JP, Gyssens IC, van der Ende ME, de Marie S, Burger DM. Urological complaints in relation to indinavir plasma concentrations in HIV-infected patients. *AIDS.* 1999 Mar 11;13(4):473-8.
71. Gieschke R, Fotteler B, Buss N, Steimer JL. Relationships between exposure to saquinavir monotherapy and antiviral response in HIV-positive patients. *Clin Pharmacokinet.* 1999 Jul;37(1):75-86.
72. Burger DM, Hoetelmans RM, Hugen PW, Mulder JW, Meenhorst PL, Koopmans PP, *et al.* Low plasma concentrations of indinavir are related to virological treatment failure in HIV-1-infected patients on indinavir-containing triple therapy. *Antivir Ther.* 1998;3(4):215-20.
73. Burger DM, Hugen PW, Aarnoutse RE, Hoetelmans RM, Jambroes M, Nieuwkerk PT, *et al.* Treatment failure of nelfinavir-containing triple therapy can largely be explained by low nelfinavir plasma concentrations. *Ther Drug Monit.* 2003 Feb;25(1):73-80.

74. Sadler BM, Gillotin C, Lou Y, Stein DS. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir after multiple oral dosing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Jan;45(1):30-7.
75. Masquelier B, Breilh D, Neau D, Lawson-Ayayi S, Lavignolle V, Ragnaud JM, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Sep;46(9):2926-32.
76. Omara E, Cirincione B, Mummaneni V, Grasela T, Grasela D. Population pharmacodynamic (PD) assessment of the safety and antiretroviral activity of BMS-232632. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, 2001. Abstract A-507.
77. Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS.* 2001 Jan 5;15(1):71-5.
78. Veldkamp AI, Weverling GJ, Lange JM, Montaner JS, Reiss P, Cooper DA, *et al.* High exposure to nevirapine in plasma is associated with an improved virological response in HIV-1-infected individuals. *AIDS.* 2001 Jun 15;15(9):1089-95.
79. Alexander CS, Asselin JJ, Ting LS, Montaner JS, Hogg RS, Yip B, *et al.* Antiretroviral concentrations in untimed plasma

- samples predict therapy outcome in a population with advanced disease. *J Infect Dis.* 2003 Aug 15;188(4):541-8.
80. Duong M, Piroth L, Peytavin G, Forte F, Kohli E, Grappin M, *et al.* Value of patient self-report and plasma human immunodeficiency virus protease inhibitor level as markers of adherence to antiretroviral therapy: relationship to virologic response. *Clin Infect Dis.* 2001 Aug 1;33(3):386-92.
81. la Porte C, Back D, Blaschke T, Boucher C, Fletcher C, Flexner C, *et al.* Updated guideline to perform therapeutic drug monitoring for antiretroviral agents. *Reviews in Antiviral Therapy.* 2006;3:4-14.
82. Gonzalez de Requena D, Bonora S, Canta F, Marrone R, D'Avolio A, Sciandra M, *et al.* Atazanavir Ctrough is associated with efficacy and safety: definition of therapeutic range. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2005. Abstract 645.
83. Marzolini C, Buclin T, Decosterd LA, Biollaz J, Telenti A. Nelfinavir plasma levels under twice-daily and three-times-daily regimens: high interpatient and low inpatient variability. *Ther Drug Monit.* 2001 Aug;23(4):394-8.
84. Barry MG, Merry C, Lloyd J, Halifax K, Carey P, Mulcahy F, *et al.* Variability in trough plasma saquinavir concentrations in HIV patients--a case for therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol.* 1998 May;45(5):501-2.

85. Torti C, Quiros-Roldan E, Tirelli V, Regazzi-Bonora M, Moretti F, Pierotti P, *et al.* Lopinavir plasma levels in salvage regimes by a population of highly active antiretroviral therapy-treated HIV-1-positive patients. *AIDS Patient Care STDS.* 2004 Nov;18(11):629-34.
86. de Maat MM, Huitema AD, Mulder JW, Meenhorst PL, van Gorp EC, Mairuhu AT, *et al.* Subtherapeutic antiretroviral plasma concentrations in routine clinical outpatient HIV care. *Ther Drug Monit.* 2003 Jun;25(3):367-73.
87. Poirier J, Meynard J, Guiard-Schmid J, Morand-Joubert L, Scheider V, Jacquemet N, *et al.* Lopinavir and ritonavir trough plasma concentrations in HIV-experienced patients treated with kaletra. 2nd International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy. Noordwijk, 2001. Abstract 1.07.
88. Khoo SH, Lloyd J, Dalton M, Bonington A, Hart E, Gibbons S, *et al.* Pharmacologic optimization of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (POPIN)--a randomized controlled trial of therapeutic drug monitoring and adherence support. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006 Apr 1;41(4):461-7.
89. Torti C, Quiros-Roldan E, Regazzi M, De Luca A, Mazzotta F, Antinori A, *et al.* A randomized controlled trial to evaluate antiretroviral salvage therapy guided by rules-based or phenotype-driven HIV-1 genotypic drug-resistance interpretation with or without concentration-controlled intervention: the Resistance and Dosage Adapted Regimens (RADAR) study. *Clin Infect Dis.* 2005 Jun 15;40(12):1828-36.

90. Murri R, Ammassari A, Gallicano K, De Luca A, Cingolani A, Jacobson D, *et al.* Patient-reported nonadherence to HAART is related to protease inhibitor levels. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000 Jun 1;24(2):123-8.
91. Wyles DL, Gerber JG. Antiretroviral drug pharmacokinetics in hepatitis with hepatic dysfunction. *Clin Infect Dis.* 2005 Jan 1;40(1):174-81.
92. Boffito M, Acosta E, Burger D, Fletcher CV, Flexner C, Garaffo R, *et al.* Therapeutic drug monitoring and drug-drug interactions involving antiretroviral drugs. *Antivir Ther.* 2005;10(4):469-77.
93. Lee LS, Andrade AS, Flexner C. Interactions between natural health products and antiretroviral drugs: pharmacokinetic and pharmacodynamic effects. *Clin Infect Dis.* 2006 Oct 15;43(8):1052-9.
94. Burger D, Hugen P, Reiss P, Gyssens I, Schneider M, Kroon F, *et al.* Therapeutic drug monitoring of nelfinavir and indinavir in treatment-naive HIV-1-infected individuals. *AIDS.* 2003 May 23;17(8):1157-65.
95. Wuth O. Rational bromide treatment: New methods for its control. *JAMA.* 1927;88:2013-7.
96. Anderson PL, Kakuda TN, Kawle S, Fletcher CV. Antiviral dynamics and sex differences of zidovudine and lamivudine triphosphate concentrations in HIV-infected individuals. *AIDS.* 2003 Oct 17;17(15):2159-68.

97. Almond L, Boffito M, Hoggard P, Bonora S, Raiteri R, Sinicco A, *et al.* Intra-individual variability in nevirapine plasma concentrations. 9th European AIDS Conference (EACS). Varsovia, 2003. Abstract 4.2/3.
98. Boffito M, Back DJ, Hoggard PG, Caci A, Bonora S, Raiteri R, *et al.* Intra-individual variability in lopinavir plasma trough concentrations supports therapeutic drug monitoring. *AIDS*. 2003 May 2;17(7):1107-8.
99. Luber A, Gunawan S, Lee S, Aquino G, Chaturvedi P, Scarsella A. Serum and plasma drug levels of amprenavir display limited inter- and intra-patient variability. 5th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Glasgow, 2000. Abstract P267.
100. Guiard-Schmid JB, Poirier JM, Meynard JL, Bonnard P, Gbadoe AH, Amiel C, *et al.* High variability of plasma drug concentrations in dual protease inhibitor regimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Mar;47(3):986-90.
101. Brundage RC, Yong FH, Fenton T, Spector SA, Starr SE, Fletcher CV. Inpatient variability of efavirenz concentrations as a predictor of virologic response to antiretroviral therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Mar;48(3):979-84.
102. D'Avolio A, Siccardi M, Sciandra M, Lorena B, Bonora S, Trentini L, *et al.* HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected

- patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Nov 15;859(2):234-40.
103. Koal T, Sibum M, Koster E, Resch K, Kaever V. Direct and fast determination of antiretroviral drugs by automated on line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(3):299-305.
104. Droste JA, Aarnoutse RE, Koopmans PP, Hekster YA, Burger DM. Evaluation of antiretroviral drug measurements by an interlaboratory quality control program. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Mar 1;32(3):287-91.
105. Fletcher CV, Anderson PL, Kakuda TN, Schacker TW, Henry K, Gross CR, *et al.* Concentration-controlled compared with conventional antiretroviral therapy for HIV infection. *AIDS.* 2002 Mar 8;16(4):551-60.
106. Clevenbergh P, Garraffo R, Durant J, Dellamonica P. PharmAdapt: a randomized prospective study to evaluate the benefit of therapeutic monitoring of protease inhibitors: 12 week results. *AIDS.* 2002 Nov 22;16(17):2311-5.
107. Bossi P, Peytavin G, Ait-Mohand H, Delaugerre C, Ktorza N, Paris L, *et al.* GENOPHAR: a randomized study of plasma drug measurements in association with genotypic resistance testing and expert advice to optimize therapy in patients failing antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2004 Sep;5(5):352-9.

108. Best BM, Goicoechea M, Witt MD, Miller L, Daar ES, Diamond C, *et al.* A randomized controlled trial of therapeutic drug monitoring in treatment-naïve and -experienced HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007 Dec 1;46(4):433-42.
109. Demeter L, Jiang H, Mukherjee L, Morse G, DiFrancesco R, Klingman K, *et al.* A prospective, randomized, controlled, open-label trial evaluating the effect of therapeutic drug monitoring and protease inhibitor dose escalation on viral load responses in antiretroviral-experienced, HIV-infected patients with a normalized inhibitory quotient. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2008. Abstract 35.
110. Ellner P, Neu H. The inhibitory quotient. A method for interpreting minimum inhibitory concentration data. *JAMA.* 1981;246:1575-8.
111. Condra JH, Petropoulos CJ, Ziermann R, Schleif WA, Shivaprakash M, Emini EA. Drug resistance and predicted virologic responses to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor therapy. *J Infect Dis.* 2000 Sep;182(3):758-65.
112. Hsu A, Granneman G, Kempf D, Isaacson J, King M, Brun S, *et al.* The Ctrough inhibitory quotient predicts virologic response to ABT-378/ritonavir (ABT-378/r) therapy in treatment-experienced patients. 5th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Glasgow, 2000. Abstract PL9.3.

113. Hoefnagel JG, Koopmans PP, Burger DM, Schuurman R, Galama JM. Role of the inhibitory quotient in HIV therapy. *Antivir Ther.* 2005;10(8):879-92.
114. Khoo S, Winston A, Back D. Combining resistance and pharmacology for optimum patient care. *Curret Opinión in HIV and AIDS.* 2007;2:157-68.
115. Marcelin A, Delaugerre C, Ktorza N, Ait-Mohand H, Wirden M, Simon A, *et al.* Genotypic and phenotypic inhibitory quotients as predictors of the virological response to a ritonavir/amprenavir containing regimen in HIV-1 protease inhibitor experienced patients. 7th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Glasgow, 2004. Abstract PL6.5.
116. Shulman N, Zolopa A, Havlir D, Hsu A, Renz C, Boller S, *et al.* Virtual inhibitory quotient predicts response to ritonavir boosting of indinavir-based therapy in human immunodeficiency virus-infected patients with ongoing viremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Dec;46(12):3907-16.
117. Bertz R, Li J, King M, Kempf D, Podzamczar D, Flexner C, *et al.* Lopinavir Inhibitory quotient predicts virologic response in highly antiretroviral-experienced patients receiving high-dose lopinavir/ritonavir. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, 2004. Abstract 134.

118. Gonzalez de Requena D, Gallego O, Valer L, Jimenez-Nacher I, Soriano V. Prediction of virological response to lopinavir/ritonavir using the genotypic inhibitory quotient. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Mar;20(3):275-8.
119. Castagna A, Gianotti N, Galli L, Danise A, Hasson H, Boeri E, *et al*. The NIQ of lopinavir is predictive of a 48-week virological response in highly treatment-experienced HIV-1-infected subjects treated with a lopinavir/ritonavir-containing regimen. *Antivir Ther*. 2004 Aug;9(4):537-43.
120. Marcelin AG, Cohen-Codar I, King MS, Colson P, Guillevic E, Descamps D, *et al*. Virological and pharmacological parameters predicting the response to lopinavir-ritonavir in heavily protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 May;49(5):1720-6.
121. Hsu A, Isaacson J, Brun S, Bernstein B, Lam W, Bertz R, *et al*. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of lopinavir-ritonavir in combination with efavirenz and two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in extensively pretreated human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan;47(1):350-9.
122. Winston A, Hales G, Amin J, van Schaick E, Cooper DA, Emery S. The normalized inhibitory quotient of boosted protease inhibitors is predictive of viral load response in treatment-experienced HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 2005 Sep 2;19(13):1393-9.

123. Barrios A, Rendon AL, Gallego O, Martin-Carbonero L, Valer L, Rios P, *et al.* Predictors of virological response to atazanavir in protease inhibitor-experienced patients. *HIV Clin Trials.* 2004 Jul-Aug;5(4):201-5.
124. Valer L, de Mendoza C, Soriano V. Predictive value of drug levels, HIV genotyping, and the genotypic inhibitory quotient (GIQ) on response to saquinavir/ritonavir in antiretroviral-experienced HIV-infected patients. *J Med Virol.* 2005 Dec;77(4):460-4.
125. Mallolas J, Blanco J, Labarga P, Vergara A, Ocampo A, Sarasa M, *et al.* Inhibitory quotient as a prognostic factor of response to a salvage antiretroviral therapy containing ritonavir-boosted saquinavir. The CIVSA Study. *HIV Med.* 2007 May;8(4):226-33.
126. Gonzalez de Requena D, Bonora S, Calcagno A, D'Avolio A, Siccardi M, Fontana S, *et al.* Tipranavir (TPV) genotypic inhibitory quotient predicts virological response at 48 weeks to TPV-based salvage regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):1066-71.
127. Moltó J, Santos J, Pérez-Álvarez N, Blanco A, Miranda C, Khoo S, *et al.* Inhibitory Quotient as a Predictor of Virological Response to Darunavir-Based Salvage Regimens. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2008. Abstract 768.
128. Sekar V, De Meyer S, Vangeneugden T, Lefebvre E, De Pauw M, van Baelen B, *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic

- (PK/PD) analyses of TMC114 in the POWER 1 and POWER 2 trials in treatment-experienced HIV-infected patients. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, 2006. Abstract J121.
129. Sekar V, De Meyer S, Vangeneugden T, Lefebvre E, De Pauw M, van Baelen B, *et al.* Absence of TMC114 exposure-efficacy and exposure-safety relationships in POWER 3. 16th International AIDS Conference. Toronto, 2006. Abstract TUPE0078.
130. Breilh D, Pellegrin I, Rouzes A, Berthoin K, Xuereb F, Budzinski H, *et al.* Virological, intracellular and plasma pharmacological parameters predicting response to lopinavir/ritonavir (KALEPHAR study). *AIDS*. 2004 Jun 18;18(9):1305-10.
131. Nakashima E, Benet LZ. An integrated approach to pharmacokinetic analysis for linear mammillary systems in which input and exit may occur in/from any compartment. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1989 Dec;17(6):673-86.
132. Gillespie WR. Noncompartmental versus compartmental modelling in clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1991 Apr;20(4):253-62.
133. Fooster DM. Noncompartmental vs. compartmental approaches to pharmacokinetic analysis. En: Atkinson AJ *et al.* *Principles of clinical pharmacology*. 1^a ed. California: Academic Press; 2001. p. 75-92.

134. Aarons L. Population pharmacokinetics: theory and practice. *Br J Clin Pharmacol.* 1991 Dec;32(6):669-70.
135. Steimer J, Vozech S, Racine-Poon A, Holford N, O'Neil R. The population approach: rationale, methods and applications in clinical pharmacology and drug development. En: Welling P, Balant L. *Handbook of experimental pharmacology.* Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 1994. p. 404-51.
136. Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1977 Oct;5(5):445-79.
137. Kelman AW, Whiting B, Bryson SM. Parameter optimisation in clinical pharmacokinetics. *Comput Programs Biomed.* 1982 Jun;14(3):239-48.
138. Sheiner LB. The population approach to pharmacokinetic data analysis: rationale and standard data analysis methods. *Drug Metab Rev.* 1984;15(1-2):153-71.
139. Whiting B, Kelman AW, Grevel J. Population pharmacokinetics. Theory and clinical application. *Clin Pharmacokinet.* 1986 Sep-Oct;11(5):387-401.
140. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics II: estimation methods. *Ann Pharmacother.* 2004 Nov;38(11):1907-15.

141. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1980 Dec;8(6):553-71.
142. Miller R. Population pharmacokinetics. En: Atkinson AJ *et al.* Principles of clinical pharmacology. 1^a ed. California: Academic Press; 2001. p. 113-119.
143. Sheiner BL, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1981 Oct;9(5):635-51.
144. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. III. Monoexponential model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1983 Jun;11(3):303-19.
145. Sheiner L, Beal S. Estimation of pooled pharmacokinetic parameters describing populations. En: Endreyi L. Kinetic data analysis. Nueva York: Plenum Press; 1981. p. 271-84.
146. Rodda E. Analysis of sets of estimates from pharmacokinetic studies. En: Endreyi L. Kinetic data analysis. New York: Plenum Press; 1981. p. 285-97.
147. Steimer JL, Mallet A, Golmard JL, Boisvieux JF. Alternative approaches to estimation of population pharmacokinetic parameters: comparison with the nonlinear mixed-effect model. *Drug Metab Rev.* 1984;15(1-2):265-92.

148. Beal SL, Sheiner LB. Estimating population kinetics. *Crit Rev Biomed Eng.* 1982;8(3):195-222.
149. Sheiner LB. Learning versus confirming in clinical drug development. *Clin Pharmacol Ther.* 1997 Mar;61(3):275-91.
150. Sheiner LB, Beal SL. Bayesian individualization of pharmacokinetics: simple implementation and comparison with non-Bayesian methods. *J Pharm Sci.* 1982 Dec;71(12):1344-8.
151. Bonate P. Nonlinear mixed effects models:Theory. En: Bonate P. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling and simulation. 1ª ed. Nueva York: Springer Science+Business Media, Inc; 2006. p. 205-265
152. Beal S, Sheiner L. NONMEM Users Guides. Icon Development Solutions, Ellicott City, Maryland, USA; 1989-98.
153. Pillai GC, Mentre F, Steimer JL. Non-linear mixed effects modeling - from methodology and software development to driving implementation in drug development science. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2005 Apr;32(2):161-83.
154. Aarons L. Software for population pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 1999 Apr;36(4):255-64.
155. Bennett JE, Wakefield JC. A comparison of a Bayesian population method with two methods as implemented in

- commercially available software. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1996 Aug;24(4):403-32.
156. Gomeni R, Pineau G, Mentre F. Population kinetics and conditional assessment of the optimal dosage regimen using the P-PHARM software package. *Anticancer Res.* 1994 Nov-Dec;14(6A):2321-6.
157. Ette EI, Williams P, Fadiran E, Ajayi FO, Onyiah LC. The process of knowledge discovery from large pharmacokinetic data sets. *J Clin Pharmacol.* 2001 Jan;41(1):25-34.
158. Ette EI, Ludden TM. Population pharmacokinetic modeling: the importance of informative graphics. *Pharm Res.* 1995 Dec;12(12):1845-55.
159. Jonsson EN, Karlsson MO. Automated covariate model building within NONMEM. *Pharm Res.* 1998 Sep;15(9):1463-8.
160. Ette EI. Statistical graphics in pharmacokinetics and pharmacodynamics: a tutorial. *Ann Pharmacother.* 1998 Jul-Aug;32(7-8):818-28.
161. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother.* 2004 Oct;38(10):1702-6.
162. Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic--pharmacodynamic models. I. Models for

- covariate effects. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1992 Oct;20(5):511-28.
163. Ette EI, Williams PJ, Lane JR. Population pharmacokinetics III: design, analysis, and application of population pharmacokinetic Studies. *Ann Pharmacother.* 2004 Dec;38(12):2136-44.
164. Karlsson MO, Sheiner LB. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1993 Dec;21(6):735-50.
165. Ette EI, Kelman AW, Howie CA, Whiting B. Analysis of animal pharmacokinetic data: performance of the one point per animal design. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1995 Dec;23(6):551-66.
166. Gabrielson J y Weiner D. Parameter estimation. En: J. Gabrielson y D. Weiner. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics data analysis: Concepts and applications.* 3ª ed. Estocolmo: Swedish Pharmaceutical Press; 2000. p. 21-41.
167. Oldfield V, Plosker GL. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs.* 2006;66(9):1275-99.
168. Sham HL, Kempf DJ, Molla A, Marsh KC, Kumar GN, Chen CM, *et al.* ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Dec;42(12):3218-24.

169. Dailly E, Gagnieu MC, Allavena C, Raffi F, Jolliet P. No significant influence of saquinavir hard-gel capsule administration on pharmacokinetics of lopinavir in combination with ritonavir: a population approach. *Ther Drug Monit.* 2005 Dec;27(6):782-4.
170. Crommentuyn KM, Kappelhoff BS, Mulder JW, Mairuhu AT, van Gorp EC, Meenhorst PL, *et al.* Population pharmacokinetics of lopinavir in combination with ritonavir in HIV-1-infected patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2005 Oct;60(4):378-89.
171. Eron JJ, Feinberg J, Kessler HA, Horowitz HW, Witt MD, Carpio FF, *et al.* Once-daily versus twice-daily lopinavir/ritonavir in antiretroviral-naive HIV-positive patients: a 48-week randomized clinical trial. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15;189(2):265-72.
172. Kaletra. Ficha técnica. Agencia Europea del Medicamento. Disponible en: www.emea.europa.eu/humandoc/Humans/EPAR/kaletra/kaletra.htm. [Último acceso Abril 2008]
173. Klein CE, Chiu YL, Awni W, Zhu T, Heuser RS, Doan T, *et al.* The tablet formulation of lopinavir/ritonavir provides similar bioavailability to the soft-gelatin capsule formulation with less pharmacokinetic variability and diminished food effect. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007 Apr 1;44(4):401-10.
174. Gustavson L, Lam W, Bertz R. Assessment of the bioequivalence and food effects for liquid and soft-gelatin capsule co-formulations of ABT-378/ritonavir in healthy

- subjects. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto, 2000. Abstract 1659.
175. Bertz R, Lam W, Brun S, Kumar G, Fields C, Orth K, *et al.* Multiple-dose pharmacokinetics (PK) of ABT-378/ritonavir (ABT-378/r) in HIV+ subjects. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, 1999. Abstract 327.
176. Boffito M, Hoggard PG, Lindup WE, Bonora S, Sinicco A, Khoo SH, *et al.* Lopinavir protein binding in vivo through the 12-hour dosing interval. *Ther Drug Monit.* 2004 Feb;26(1):35-9.
177. Crommentuyn KM, Mulder JW, Mairuhu AT, van Gorp EC, Meenhorst PL, Huitema AD, *et al.* The plasma and intracellular steady-state pharmacokinetics of lopinavir/ritonavir in HIV-1-infected patients. *Antivir Ther.* 2004 Oct;9(5):779-85.
178. Hoggard P, Meaden E, Newton P, Williams I, Tjia J, Aldam D, *et al.* Intracellular accumulation of lopinavir and ritonavir in HIV patients receiving Kaletra. 3rd International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy. Washington, 2002. Abstract 5.2.
179. Capparelli EV, Holland D, Okamoto C, Gragg B, Durelle J, Marquie-Beck J, *et al.* Lopinavir concentrations in cerebrospinal fluid exceed the 50% inhibitory concentration for HIV. *AIDS.* 2005 Jun 10;19(9):949-52.

180. Yilmaz A, Stahle L, Hagberg L, Svennerholm B, Fuchs D, Gisslen M. Cerebrospinal fluid and plasma HIV-1 RNA levels and lopinavir concentrations following lopinavir/ritonavir regimen. *Scand J Infect Dis.* 2004;36(11-12):823-8.
181. Kumar GN, Jayanti VK, Johnson MK, Uchic J, Thomas S, Lee RD, *et al.* Metabolism and disposition of the HIV-1 protease inhibitor lopinavir (ABT-378) given in combination with ritonavir in rats, dogs, and humans. *Pharm Res.* 2004 Sep;21(9):1622-30.
182. Kappelhoff BS, Huitema AD, Crommentuyn KM, Mulder JW, Meenhorst PL, van Gorp EC, *et al.* Development and validation of a population pharmacokinetic model for ritonavir used as a booster or as an antiviral agent in HIV-1-infected patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2005 Feb;59(2):174-82.
183. Hsu A, Granneman GR, Witt G, Locke C, Denissen J, Molla A, *et al.* Multiple-dose pharmacokinetics of ritonavir in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 May;41(5):898-905.
184. Dailly E, Reliquet V, Raffi F, Jolliet P. A population approach to study the influence of nevirapine administration on lopinavir pharmacokinetics in HIV-1 infected patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005 Apr;61(2):153-6.
185. Best R, Haubrich R, Miller C, Witt M, Kemper C, Squires K, *et al.* Population pharmacokinetics of lopinavir/ritonavir in experienced patients. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2003. Abstract 527.

186. Gonzalez-Requena D, Nunez M, Jimenez-Nacher I, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. Short communication: liver toxicity of lopinavir-containing regimens in HIV-infected patients with or without hepatitis C coinfection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Jul;20(7):698-700.
187. Canta F, Marrone R, Bonora S, D'Avolio A, Sciandra M, Sinicco A, *et al*. Pharmacokinetics and hepatotoxicity of lopinavir/ritonavir in non-cirrhotic HIV and hepatitis C virus (HCV) co-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Feb;55(2):280-1.
188. Peng JZ, Pulido F, Causemaker SJ, Li J, Lorenzo A, Cepeda C, *et al*. Pharmacokinetics of lopinavir/ritonavir in HIV/hepatitis C virus-coinfected subjects with hepatic impairment. *J Clin Pharmacol*. 2006 Mar;46(3):265-74.
189. Jullien V, Urien S, Hirt D, Delaugerre C, Rey E, Teglas JP, *et al*. Population analysis of weight-, age-, and sex-related differences in the pharmacokinetics of lopinavir in children from birth to 18 years. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Nov;50(11):3548-55.
190. Chadwick E, Rodman J, Palumbo P, Persaud D, Chen J, Gardella J, *et al*. A prospective evaluation of pharmacologic, virologic, and immunologic parameters of lopinavir/ritonavir for HIV-1-infected infants < 6 months of age. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2005. Abstract 766.

191. Saez-Llorens X, Violari A, Deetz CO, Rode RA, Gomez P, Handelsman E, *et al.* Forty-eight-week evaluation of lopinavir/ritonavir, a new protease inhibitor, in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 Mar;22(3):216-24.
192. Mirochnick M, Capparelli E. Pharmacokinetics of antiretrovirals in pregnant women. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(15):1071-87.
193. Stek AM, Mirochnick M, Capparelli E, Best BM, Hu C, Burchett SK, *et al.* Reduced lopinavir exposure during pregnancy. *AIDS.* 2006 Oct 3;20(15):1931-9.
194. Best B, Stek A, Hu C, Burchett S, Rossi S, Smith E, *et al.* High-dose Lopinavir and Standard-dose Emtricitabine Pharmacokinetics during Pregnancy and Postpartum. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2008. Abstract 629.
195. Lyons F, Lechelt M, De Ruiter A. Steady-state lopinavir levels in third trimester of pregnancy. *AIDS.* 2007 May 11;21(8):1053-4.
196. Lyons F, Lechelt M, Magaya V, Issa R, Deruiter A. Adequate trough lopinavir levels with standard dosing in pregnancy. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, 2006. Abstract 709.
197. Mirochnick M, Stek A, Capparelli E, Best B, Holland D, Connor J, *et al.* Adequate lopinavir exposure achieved with a

- higher dose during the third trimestre of pregnancy. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, 2006. Abstract 710.
198. Carr R, Andre A, Bertz R. Concomitant administration of ABT-378/ritonavir (ABT-378/r). Results in a clinically important pharmacokinetic (PK) interaction with atorvastatin but not pravastatin. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto, 2000. Abstract 1644.
199. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet.* 2000 Jan;38(1):41-57.
200. McCance-Katz EF, Rainey PM, Friedland G, Jatlow P. The protease inhibitor lopinavir-ritonavir may produce opiate withdrawal in methadone-maintained patients. *Clin Infect Dis.* 2003 Aug 15;37(4):476-82.
201. la Porte CJ, Colbers EP, Bertz R, Voncken DS, Wikstrom K, Boeree MJ, *et al.* Pharmacokinetics of adjusted-dose lopinavir-ritonavir combined with rifampin in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 May;48(5):1553-60.
202. Hsu A, Bertz R, Ashbrenner E. Interaction of ABT-378/ritonavir with protease inhibitors in healthy volunteers. 1st International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy. Noordwijk, 2000. Abstract 2.4.

203. Raguin G, Taburet A, Chene G, Morand-Joubert L, Droz C, Le Tiec C, *et al.* Pharmacokinetic parameters and virological response to the combination of lopinavir/ritonavir (LPV/r) and amprenavir (APV) in HIV-infected patients with multiple treatment failures: week-6 results of Puzzle 1-ANRS study. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Seattle, 2002. Abstract 420.
204. Lim ML, Min SS, Eron JJ, Bertz RJ, Robinson M, Gaedigk A, *et al.* Coadministration of lopinavir/ritonavir and phenytoin results in two-way drug interaction through cytochrome P-450 induction. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 Aug 15;36(5):1034-40.
205. Murphy RL, Brun S, Hicks C, Eron JJ, Gulick R, King M, *et al.* ABT-378/ritonavir plus stavudine and lamivudine for the treatment of antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection: 48-week results. *AIDS.* 2001 Jan 5;15(1):F1-9.
206. Delfraissy J, Flandre P, Delaugerre C, Horban A, Girard P, Rouzioux C, *et al.* Monark trial (monotherapy antiretroviral kaletra): 48-week análisis of lopinavir/ritonavir (LPV/r) monotherapy compared to LPV/r + zidovudine/lamivudine (AZT/3TC) in antiretroviral-naïve patients. 16th International AIDS Conference. Toronto, 2006. Abstract ThLB0202.
207. DeJesus E, Ortiz R, Khanlou H, Voronin E, Van Lunzen J, Andrade-Villanueva J, *et al.* Efficacy and safety of darunavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir in ARV treatment-naïve HIV-1-infected patients at week 48: ARTEMIS

- (TMC114-C21). 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, 2007. Abstract H-718b.
208. Walmsley S, Bernstein B, King M, Arribas J, Beall G, Ruane P, *et al.* Lopinavir-ritonavir versus nelfinavir for the initial treatment of HIV infection. *N Engl J Med.* 2002 Jun 27;346(26):2039-46.
209. Eron J, Jr., Yeni P, Gathe J, Jr., Estrada V, DeJesus E, Staszewski S, *et al.* The KLEAN study of fosamprenavir-ritonavir versus lopinavir-ritonavir, each in combination with abacavir-lamivudine, for initial treatment of HIV infection over 48 weeks: a randomised non-inferiority trial. *Lancet.* 2006 Aug 5;368(9534):476-82.
210. Riddler S, Haubrich R, DiRienzo G, Peeples L, Powderly W, Klingma K, *et al.* A prospective, randomized, phase III trial of NRTI-, PI-, and NNRTI-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection -- ACTG 5142. XVI International AIDS Conference. Toronto, 2006. Abstract THLB0204.
211. Molina J, Andrade-Villanueva J, Echevarria J, Chetchotisakd P, Corral J, David N, *et al.* Efficacy and Safety of Once-daily Atazanavir/Ritonavir Compared to Twice-daily Lopinavir/Ritonavir, Each in Combination with Tenofovir and Emtricitabine in ARV-naive HIV-1-infected Subjects: The CASTLE Study, 48-week Results. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2008. Abstract 37.

212. Hicks C, King MS, Gulick RM, White AC, Jr., Eron JJ, Jr., Kessler HA, *et al.* Long-term safety and durable antiretroviral activity of lopinavir/ritonavir in treatment-naive patients: 4 year follow-up study. *AIDS*. 2004 Mar 26;18(5):775-9.
213. Landay A, da Silva BA, King MS, Albrecht M, Benson C, Eron J, *et al.* Evidence of ongoing immune reconstitution in subjects with sustained viral suppression following 6 years of lopinavir-ritonavir treatment. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 1;44(5):749-54.
214. Malan N, Krantz E, David N, Kastango K, Frederick D, Matthew M, *et al.* Efficacy and safety of atazanavir-based therapy in antiretroviral naïve HIV-1 infected subjects, both with and without ritonavir: 48 week results from AI424-089. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, 2006. Abstract 107LB.
215. King MS, Rode R, Cohen-Codar I, Calvez V, Marcelin AG, Hanna GJ, *et al.* Predictive genotypic algorithm for virologic response to lopinavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep;51(9):3067-74.
216. Benson CA, Deeks SG, Brun SC, Gulick RM, Eron JJ, Kessler HA, *et al.* Safety and antiviral activity at 48 weeks of lopinavir/ritonavir plus nevirapine and 2 nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in human immunodeficiency virus type 1-infected protease inhibitor-experienced patients. *J Infect Dis*. 2002 Mar 1;185(5):599-607.

217. Clumeck N, Brun S, Sylte J, Isaacson J, Chen S, Lazzarin A, *et al.* Kaletra (ABT-378/r) and efavirenz: One year safety/efficacy evaluation and phenotypic breakpoints in multiple-PI-experienced patients. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, 2001. Abstract 525.
218. Madruga JV, Berger D, McMurchie M, Suter F, Banhegyi D, Ruxrungtham K, *et al.* Efficacy and safety of darunavir-ritonavir compared with that of lopinavir-ritonavir at 48 weeks in treatment-experienced, HIV-infected patients in TITAN: a randomised controlled phase III trial. *Lancet.* 2007 Jul 7;370(9581):49-58.
219. Cooper D, Hicks C, Cahn P, Lazzarin A, Walmsley S, Arasteh K, *et al.* 24-week RESIST Study analyses: the efficacy of tipranavir/ritonavir is superior to lopinavir/ritonavir, and the TPV/r treatment response is enhanced by inclusion of genotypically active antiretrovirals in the optimized background regimen. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 2005. Abstract 560.
220. Johnson M, Grinsztejn B, Rodriguez C, Coco J, DeJesus E, Lazzarin A, *et al.* Atazanavir plus ritonavir or saquinavir, and lopinavir/ritonavir in patients experiencing multiple virological failures. *AIDS.* 2005 Jan 28;19(2):153-62.
221. Carrillo A, Stewart KD, Sham HL, Norbeck DW, Kohlbrenner WE, Leonard JM, *et al.* In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants with

- increased resistance to ABT-378, a novel protease inhibitor. *J Virol.* 1998 Sep;72(9):7532-41.
222. Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, Brun SC, Xu Y, Real K, *et al.* Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol.* 2001 Aug;75(16):7462-9.
223. Parkin NT, Chappey C, Petropoulos CJ. Improving lopinavir genotype algorithm through phenotype correlations: novel mutation patterns and amprenavir cross-resistance. *AIDS.* 2003 May 2;17(7):955-61.
224. Bongiovanni M, Bini T, Adorni F, Meraviglia P, Capetti A, Tordato F, *et al.* Virological success of lopinavir/ritonavir salvage regimen is affected by an increasing number of lopinavir/ritonavir-related mutations. *Antivir Ther.* 2003 Jun;8(3):209-14.
225. Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, Brun SC, Sylte J, Richards B, *et al.* Analysis of the virological response with respect to baseline viral phenotype and genotype in protease inhibitor-experienced HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir therapy. *Antivir Ther.* 2002 Sep;7(3):165-74.
226. Maillard A, Chaplain JM, Tribut O, Bentue-Ferrer D, Tattevin P, Arvieux C, *et al.* The use of drug resistance algorithms and genotypic inhibitory quotient in prediction of lopinavir-ritonavir treatment response in human immunodeficiency virus type 1

- protease inhibitor-experienced patients. *J Clin Virol.* 2007 Feb;38(2):131-8.
227. Boffito M, Arnaudo I, Raiteri R, Bonora S, Sinicco A, Di Garbo A, *et al.* Clinical use of lopinavir/ritonavir in a salvage therapy setting: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *AIDS.* 2002 Oct 18;16(15):2081-3.
228. Podzamczar D, King MS, Klein CE, Flexner C, Katlama C, Havlir DV, *et al.* High-dose lopinavir/ritonavir in highly treatment-experienced HIV-1 patients: efficacy, safety, and predictors of response. *HIV Clin Trials.* 2007 Jul-Aug;8(4):193-204.
229. Harrigan PR, Hogg RS, Dong WW, Yip B, Wynhoven B, Woodward J, *et al.* Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large antiretroviral-naïve cohort initiating triple antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2005 Feb 1;191(3):339-47.
230. de Maat MM, ter Heine R, Mulder JW, Meenhorst PL, Mairuhu AT, van Gorp EC, *et al.* Incidence and risk factors for nevirapine-associated rash. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003 Sep;59(5-6):457-62.
231. Da Silva B, King M, Cernohous P. Lopinavir/ritonavir (LPV/r) safety, tolerability and efficacy in HIV patients co-infected with hepatitis C and/or hepatitis B: review of clinical trials. XV International AIDS Conference. Bangkok, 2004. Abstract MoPeB3285.

232. Meraviglia P, Schiavini M, Castagna A, Vigano P, Bini T, Landonio S, *et al.* Lopinavir/ritonavir treatment in HIV antiretroviral-experienced patients: evaluation of risk factors for liver enzyme elevation. *HIV Med.* 2004 Sep;5(5):334-43.
233. Puoti M, Torti C, Ripamonti D, Castelli F, Zaltron S, Zanini B, *et al.* Severe hepatotoxicity during combination antiretroviral treatment: incidence, liver histology, and outcome. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Mar 1;32(3):259-67.
234. Sulkowski MS, Mehta SH, Chaisson RE, Thomas DL, Moore RD. Hepatotoxicity associated with protease inhibitor-based antiretroviral regimens with or without concurrent ritonavir. *AIDS.* 2004 Nov 19;18(17):2277-84.
235. Sulkowski MS, Thomas DL, Chaisson RE, Moore RD. Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection. *JAMA.* 2000 Jan 5;283(1):74-80.
236. Aranzabal L, Casado JL, Moya J, Quereda C, Diz S, Moreno A, *et al.* Influence of liver fibrosis on highly active antiretroviral therapy-associated hepatotoxicity in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis.* 2005 Feb 15;40(4):588-93.
237. Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD, Pirie D, *et al.* Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet.* 1986 Mar 8;1(8480):523-5.

238. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, *et al.* Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005 Feb;128(2):343-50.
239. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*. 2001 Apr 7;357(9262):1069-75.
240. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, *et al.* HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Dec 15;40(5):538-44.
241. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, *et al.* Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006 Jun;43(6):1317-25.
242. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003 Aug;38(2):518-26.
243. de Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A, Ziol M, Roulot D, Marcellin P, *et al.* Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected

- patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006 Feb 1;41(2):175-9.
244. Lu JF, Blaschke TF, Flexner C, Rosenkranz SL, Sheiner LB. Model-based analysis of the pharmacokinetic interactions between ritonavir, nelfinavir, and saquinavir after simultaneous and staggered oral administration. *Drug Metab Dispos.* 2002 Dec;30(12):1455-61.
245. Sale M, Sadler BM, Stein DS. Pharmacokinetic modeling and simulations of interaction of amprenavir and ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Mar;46(3):746-54.
246. Moltó J, Valle M, Blanco A, Negro E, DelaVarga M, Miranda C, *et al.* Lopinavir/ritonavir pharmacokinetics in HIV and hepatitis C virus co-infected patients without liver function impairment: influence of liver fibrosis. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(1):85-92.
247. Vrijens B, Tousset E, Rode R, Bertz R, Mayer S, Urquhart J. Successful projection of the time course of drug concentration in plasma during a 1-year period from electronically compiled dosing-time data used as input to individually parameterized pharmacokinetic models. *J Clin Pharmacol.* 2005 Apr;45(4):461-7.
248. Dailly E, Allavena C, Raffi F, Jolliet P. Pharmacokinetic evidence for the induction of lopinavir metabolism by efavirenz. *Br J Clin Pharmacol.* 2005 Jul;60(1):32-4.

249. Colombo S, Buclin T, Decosterd LA, Telenti A, Furrer H, Lee BL, *et al.* Orosomucoid (alpha1-acid glycoprotein) plasma concentration and genetic variants: effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Oct;80(4):307-18.
250. Hoggard PG, Owen A. The mechanisms that control intracellular penetration of the HIV protease inhibitors. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Mar;51(3):493-6.
251. Holladay JW, Dewey MJ, Michniak BB, Wiltshire H, Halberg DL, Weigl P, *et al.* Elevated alpha-1-acid glycoprotein reduces the volume of distribution and systemic clearance of saquinavir. *Drug Metab Dispos.* 2001 Mar;29(3):299-303.
252. Jones K, Hoggard PG, Khoo S, Maher B, Back DJ. Effect of alpha1-acid glycoprotein on the intracellular accumulation of the HIV protease inhibitors saquinavir, zidovudine and zalcitabine in vitro. *Br J Clin Pharmacol.* 2001 Jan;51(1):99-102.
253. Barrett JS, Labbe L, Pfister M. Application and impact of population pharmacokinetics in the assessment of antiretroviral pharmacotherapy. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(6):591-625.

AGRADECIMIENTOS

A los directores de este trabajo Dr. Bonaventura Clotet Sala y Dra. Marta Valle Cano. Al Dr. Bonaventura Clotet Sala por haber colaborado en la dirección de este trabajo y haberme dado la oportunidad de desarrollar este proyecto poniendo a mi alcance los medios necesarios. A la Dra. Marta Valle Cano por haber aceptado dirigir este trabajo, haber mostrado infinita paciencia y haberme animado constantemente a seguir adelante.

Al Dr. Sebastián Videla Cés, por haberme prestado su ayuda y haberme puesto en contacto con el personal del Centre d'Investigació del Medicament del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; sin su ayuda, este proyecto no habría sido posible.

A los médicos, enfermeros y demás personal de la Fundación “Lluita contra la Sida” por su ayuda en el reclutamiento de pacientes y en el desarrollo de los estudios que componen este trabajo. Especialmente a Eugenia Negrodo, a Carmina R Fumaz y a José Muñoz por haberme permitido ser su amigo además de su compañero y por su apoyo en los momentos difíciles. También a Pepe y Cristina Miranda por su dedicación a este proyecto y su inestimable ayuda, así como a Nuria Pérez, por su asesoramiento estadístico, y sus consejos.

A Asunción Blanco y a Samandhy Cedeño, por su ayuda en la determinación de las concentraciones plasmáticas de los antirretrovirales.

A Silvia Gel, por su gran ayuda con los trámites necesarios para llevar a cabo los estudios que componen esta tesis y por haber realizado la monitorización de los estudios durante su desarrollo.

Al Dr. Manuel José Barbanj y al resto del personal del Centre d'Investigació del Medicament del Insitut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos y haberme adoptado durante seis meses en su unidad.

A los Dres. Carlos Alonso Villaverde (Hospital Universitari Sant Joan de Reus), Josep Cucurull (Hospital de Figueres), Pere Domingo (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona), Enric Pedrol (Fundació Hospital-Asil de Granoller) y Josep Vilaró (Hospital de Vic) por su interés en este proyecto y su gran ayuda para reclutar pacientes en otros centros.

A los co-autores de los artículos que componen la presente tesis doctoral, por su colaboración tanto en el desarrollo de los estudios como en la elaboración de los manuscritos incluidos en la misma.

Al Servicio de Medicina Interna y a mis amigos y compañeros del Hospital General Universitario de Elche. Especialmente al siempre recordado Dr. Ángel Sánchez Sevillano y a la Dra. Antonia Mora Rufete. A Ángel porque me enseñó a disfrutar del ejercicio de la Medicina Interna, y a Toñi porque junto a ella descubrí el apasionante área de la infección por el VIH-sida, campo en el que posteriormente he podido desarrollarme profesionalmente.

Al Insituto de Salud Carlos III, por haber otorgado una ayuda para mi contrato como médico investigador en formación durante los años 2004-2007, a la Fundación para la Investigación y Prevención del Sida en España (FIPSE), a la Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA (RIS, RD06/0006), a la obra social de la Caixa

de Sabadell y a la Fundación Lluita contra la Sida, por haber financiado parcialmente la ejecución de los estudios que integran este trabajo.

A Albert y a toda mi familia, por sus palabras de ánimo y su infinita paciencia.

Finalmente, me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a los pacientes que han participado en los estudios que componen esta tesis y que son, finalmente, a quienes va dirigido este trabajo.

