



Estudi pilot pel tractament de la malaltia per Citomegalovirus amb valganciclovir en receptors d'un trasplantament d'òrgan sòlid. Avaluació de l'eficàcia i estudi farmacocinètic

Ana M. Caldés Escuder,

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

**ESTUDI PILOT PEL TRACTAMENT DE LA MALALTIA
PER CITOMEGALOVIRUS AMB VALGANCICLOVIR EN
RECEPTORS D'UN TRASPLANTAMENT D'ÒRGAN SÓLID.**

Avaluació de l'eficàcia i estudi farmacocinètic.

Ana M. Caldés Escuder

ANY 2013

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

Programa de Doctorat de Recerca, Desenvolupament i Control de
Medicaments

Bienni 2013-2014

**ESTUDI PILOT PEL TRACTAMENT DE LA MALALTIA PER
CITOMEGALOVIRUS AMB VALGANCICLOVIR EN RECEPTORS D'UN
TRASPLANTAMENT D'ÒRGAN SÓLID.**

Avaluació de l'eficàcia i estudi farmacocinètic

Memòria presentada per Ana M. Caldés Escuder per optar al títol de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Directors

Dra. Helena Colom Codina

Departament de Farmàcia i Tecnologia
Farmacèutica
Facultat de Farmàcia

Dr. Josep M. Grinyó Boira

Departament Ciències Clíniques
Facultat Medicina



Tutora

Dra. Helena Colom Codina

La presente tesis doctoral ha sido desarrollada en el Hospital Universitario de Bellvitge y el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Salvador Gil-Vernet la idea inicial de realizar el ensayo clínico del que surgió el presente proyecto de tesis. Agradecer también al resto de profesionales del Hospital de Bellvitge que participaron tanto en el diseño como en el desarrollo del mismo, haciendo mención a la memoria del Dr. Gabriel Rufí del Servicio de Infecciosas por sus comentarios constructivos en el proyecto inicial. También al Dr. Jordi Niubó de Microbiología, siempre expectante ante la aparición de nuevos pacientes con infección por hCMV y a la Dra. Yolanda Armendariz del Laboratorio de Bioquímica, por sus aportaciones farmacocinéticas.

También agradecer a los equipos médicos de los Servicios de Nefrología, Digestivo y Cardiología que incluyeron a los pacientes participantes y como no, a los pacientes, que de manera anónima y desinteresada participaron en la investigación y pasaron las horas junto a nuestro equipo de enfermeras (María Sarrias, Ester Díaz, Mar Blázquez y Emma Caballero) que se encargaron de realizar la extracción de las muestras de sangre para las determinaciones farmacocinéticas.

Para continuar quiero agradecer a mis directores de tesis, su dirección y apoyo incondicional en todo momento. Me siento muy afortunada de que me hayan "apadrinado".

Al Dr. Josep M. Grinyó "el jefe" junto al que he crecido profesionalmente y que me ha transmitido su pasión por la investigación y el trabajo bien hecho.

Y a la Dra. Helena Colom, que desde un ángulo de vista más teórico, ha compartido desinteresadamente todos sus conocimientos y ha trabajado incansablemente en el desarrollo de los modelos farmacocinéticos y escritura de artículos. Para mí es un modelo de persona y de cultura del esfuerzo.

Expresar mi cariño a todo el equipo del Servicio de Nefrología (a los que están y a los que ya se han ido), mucho más que compañeros de trabajo y en especial a las "nefro-girls" con los que he compartido muy buenos momentos.

Finalmente también el reconocimiento a mi familia, que siempre han estado y están ahí, apoyándome durante todo mi desarrollo personal y profesional y también a la familia que está en camino, que me ha dado el "último empujón" para que hoy estemos todos aquí reunidos en la defensa de este proyecto de tesis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 CITOMEGALOVIRUS HUMANO	17
1.1.1 Ciclo de replicación del citomegalovirus humano.....	19
1.2 hCMV EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO	22
1.2.1 Factores de riesgo para el desarrollo de hCMV.....	22
1.2.2 Efectos directos e indirectos del hCMV	26
1.3 TERAPIA FARMACOLÓGICA PARA EL hCMV.	29
1.1.1 Ganciclovir (GCV).....	30
1.1.2 Valganciclovir (VGC)	33
1.1.3 Estudios clínicos de eficacia y farmacocinética	35
1.4 PREVENCIÓN y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD POR CITOMEGALOVIRUS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO (TOS).....	42
1.4.1 Prevención de la enfermedad por hCMV en el TOS.....	42
1.4.2 Tratamiento de la enfermedad por hCMV en el TOS.....	45
1.4.3 Tratamiento de las resistencias en la enfermedad por hCMV en el TOS.	46
1.5 FARMACOMETRÍA.....	49
1.5.1 Métodos de análisis de datos farmacocinéticos	49
2. HIPÓTESIS	71
3. OBJETIVOS	75
4. RESULTADOS	79
4.1 Capítulo1:	81
Caldés A, Gil-Vernet S, Armendariz Y, Colom H, Pou L, Niubó J, Lladó L, TorrasJ, Manito N, Rufí G, Grinyó JM. Sequential treatment of cytomegalovirus infection or disease with a short course of intravenous ganciclovir followed by oralvalganciclovir: efficacy, safety, and pharmacokinetics. <i>Transpl Infect Dis.</i> 2010 Jun;12(3):204-12.	
4.2 Capítulo2:	93
Caldés A, Colom H, Armendariz Y, Garrido MJ, Troconiz IF, Gil-Vernet S, Lloberas N, Pou L, Peraire C, Grinyó JM. Population pharmacokinetics of ganciclovir after intravenous ganciclovir and oral valganciclovir administration in solid organ transplant patients infected with cytomegalovirus. <i>Antimicrob Agents Chemother.</i> 2009 Nov;53(11):4816- 24.	
5. DISCUSIÓN	105
6. CONCLUSIONES.....	127
7. BIBLIOGRAFIA.....	131

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: FACTORES ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD POR HCMV EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO.....	23
TABLA 2: EFECTOS INDIRECTOS ASOCIADOS A CITOMEGALOVIRUS.....	27
TABLA 3: FÓRMULA ESTRUCTURAL, MOLECULAR Y PESO MOLECULAR LAS 2 FORMAS QUÍMICAS DE GANCICLOVIR.....	30
TABLA 4: FORMULA ESTRUCTURAL, MOLECULAR Y PESO MOLECULAR DEL VALGANCICLOVIR.	34
TABLA 5: PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICOS DEL GANCICLOVIR ORAL, IV Y DEL VALGANCICLOVIR EN BASE A LAS INFORMACIONES DE PRODUCTO DE ROCHE.....	40
TABLA 6: DOSIFICACIÓN DEL GANCICLOVIR, AJUSTADA A LA FUNCIÓN RENAL DEL PACIENTE DE ACUERDO CON LA FICHA TÉCNICA.	41
TABLA 7: DOSIFICACIÓN DEL VALGANCICLOVIR, AJUSTADA A LA FUNCIÓN RENAL DEL PACIENTE DE ACUERDO CON LA FICHA TÉCNICA.	41
TABLA 8: VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA PROFILAXIS Y LA TERAPIA ANTICIPADA.	44
TABLA 9: ESTUDIOS DE TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN/ ENFERMEDAD POR HCMV PUBLICADOS.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: IMÁGEN VIRTUAL TRIDIMENSIONAL DEL CITOMEGALOVIRUS HUMANO CON SUS PRINCIPALES COMPONENTES.....	18
FIGURA 2: EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS GENES TRAS LA INFECCIÓN POR EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV).	21
FIGURA 3: INTERRELACIÓN ENTRE LA CARGA VIRAL Y LA PROBABILIDAD DE DESARROLLAR ENFERMEDAD POR CITOMEGALOVIRUS HUMANO.....	26
FIGURA 4: MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS DIFERENTES FÁRMACOS ANTIVIRALES.	30
FIGURA 5: APROXIMACIONES POSIBLES PARA EL ANÁLISIS DE DATOS FARMACOCINÉTICOS.....	50
FIGURA 6: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS MODELOS DE UNO (A), DOS (B) Y TRES (C) COMPARTIMENTOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE UN FÁRMACO MEDIANTE UN BOLUS INTRAVENOSO.	53
FIGURA 7. MODELOS NO LINEALES DE EFECTOS MIXTOS (MODELOS JERÁRQUICOS): EFECTOS ALEATORIOS RESIDUALES (E) ANIDADOS DENTRO DE LOS EFECTOS ALEATORIOS INTERINDIVIDUALES (H).....	57
FIGURA 8: GRÁFICOS DE BONDAD DE AJUSTE: CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES VS CONCENTRACIONES POBLACIONALES PREDICHAS (PANEL SUPERIOR IZQUIERDO), CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES VS CONCENTRACIONES INDIVIDUALES PREDICHAS (PANEL SUPERIOR DERECHO), RESIDUALES INDIVIDUALES	

PONDERADOS (IWRES) VS CONCENTRACIONES INDIVIDUALES
PREDICHAS (PANEL INFERIOR IZQUIERDO) Y RESIDUALES
CONDICIONALES POBLACIONALES VS TIEMPO (PANEL INFERIOR
DERECHO).65

FIGURA 9. EVALUACIÓN VISUAL PREDICTIVA CORREGIDA POR LA PREDICCIÓN
CORRESPONDIENTE A LOS PERFILES DE CONCENTRACIONES SÉRICAS
DE GANCICLOVIR OBTENIDOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN IV (PANEL
IZQUIERDO) Y ORAL(PANEL DERECHO)..123

aa:	aminoácido
Ac:	Anticuerpo
ACV:	Aciclovir
ADVAN	Modelos estructurales en la librería de NONMEM
AIC	Criterio de Akaike
ATG	Globulinas anti-timocíticas
AUC:	Area bajo la curva de niveles plasmáticos
BAL:	Lavado bronco-alveolar
CCR-5	quimiocina receptora de tipo 5
CDV	Cidofovir
CI50	Concentración inhibitoria 50%
CL	Aclaramiento plasmático o sérico o total
Cmax	Concentración máxima
CMV	Citomegalovirus
CREA	Creatinina
	CV% coeficiente de variación porcentual
CWRES	Residuales poblacionales ponderados
D	Dosis
D+/R-	Donante seropositivo/ receptor seronegativo
D+/R+	Donante seropositivo/ receptor seropositivo
dGTP	desoxiguanosintrifosfato
DHPG	Dihidroxifosfoguanosina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DV	Dato observado
E	Tasa de extracción
EBV	Epstein-Barr virus
EER%	Error estándar relativo
ELISPOT	Ensayo de inmunoabsorción unida a enzimas
EMA	Agencia Europea del Medicamento
F	Biodisponibilidad.
Fc:	Fijación del complemento
FDA	Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
FO	Método de estimación de primer orden
FOCE	Método de estimación de primer orden condicional
FOCE I	Método de estimación de estimación de primer orden condicional con interacción
FOS	Foscarnet
Ganciclovir-TP	Ganciclovir trifosfato
GCV	Ganciclovir.
GESITRA	Grupo Español infecciones en el trasplante
gB	Glicoproteína B
gH	Glicoproteína H
gL	Glicoproteína L
gM	Glicoproteína M
gN	Glicoproteína N
gO	Glicoproteína O

HBV	Virus hepatitis B
hCMV	Citomegalovirus humano
HCV	Virus hepatitis C
HDI	Hemodiálisis
HHV	Virus herpes humano
HPLC	Cromatografía líquida d'alta eficacia
CI 50	Concentración inhibitoria 50%
IE	Referido a los genes inmediato-tempranos (Immediate early).
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IPRED	Concentraciones individuales predichas
IV	Intravenoso
IVIg	Inmunoglobulinas intravenosas inespecíficas
IWRES	Residuales individuales ponderados
K=Kel	Constante de velocidad de eliminación
Ka	Constante de la velocidad de absorción
LTR	Test de razón de máxima similitud
MBL	Manosa binding lectin
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica de monocitos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOFV=OFV	Mínimo valor de la función objetivo
MRT	Tiempo medio de residencia
Mtor	Diana de rapamicina en células de mamífero
NONMEM	Modelos no lineales de efectos mixtos
NPC	Evaluación predictiva numérica
NPDE	Errores de distribución normalizados por la predicción
NPEM	Método no paramétrico de máxima expectación
NPML	Método no paramétrico de máxima verosimilitud
OKT3	Muromonab-CD3
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
pc-VPC	Evaluación predictiva visual corregida por la predicción
PD-1	Cell programated death-1
PEPT	Transportador peptídico
PK	Farmacocinética
PPC	Evaluación predictiva posterior
PRED	Concentraciones predichas poblacionales
PTLD	Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante
Q=CLD	Aclarimiento intercompartmental
RE	Error residual
RNA	ácido ribonucleico
SIDA	Síndrome inmunodeficiencia adquirida
t 1/2:	semivida de eliminación
t1/2 α	Semivida de la fase de disposición rápida α
t1/2 β	Semivida de la fase de disposición lenta β
t1/2KA	Semivida asociada a la constante de velocidad de absorción
TLR	Receptor de tipo Toll-like
tmax	Tiempo al que se alcanza la concentración máxima

TNF- α	factor de necrosis tumoral α
TOS	Trasplante de \acute{o} rgano s \acute{o} lido
TRANS	Parametrizaci \acute{o} n de los modelos estructurales en NONMEM
TV	Valor t \acute{i} pico
V	Volumen
VGC	Valganciclovir
VII	Variabilidad interindividual
VIH	Virus inmunodeficiencia humana
VZV	Virus varicella zoster
λ_z	Constante de velocidad del proceso asociado a la fase monoexponencial terminal
θ	Efectos fijos
η	Efectos aleatorios interindividuales
ε	Efectos aleatorios residuales
ω	Desviaci \acute{o} n standard de la distribuci \acute{o} n de los errores aleatorios interindividuales
σ	Desviaci \acute{o} n standard de la distribuci \acute{o} n de los efectos aleatorios residuales

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CITOMEGALOVIRUS HUMANO

El citomegalovirus humano o virus herpes humano 5 es un virus ubicuo de alrededor de 200-300 nm de diámetro, dependiendo del grosor del tegumento y estado de la envuelta. La característica que define a los virus de la familia *herpesviridae*, es su capacidad de latencia y reactivación.

Tanto la infección primaria como las reactivaciones se presentan generalmente en forma asintomática o con características clínicas inespecíficas que son pasajeras en sujetos inmunocompetentes [1] Algunas personas pueden sufrir síntomas, es decir, reactivación sintomática, con fiebre prolongada y una leve hepatitis, características de una mononucleosis infecciosa. En la mayoría de las ocasiones estos síntomas pasan desapercibidos o son confundidos con otras enfermedades. En respuesta a la infección o reactivación, el cuerpo genera respuesta inmune, en forma de anticuerpos. Las reactivaciones, puede ocurrir en cualquier momento, pero especialmente cuando el sistema inmune está alterado o débil. También pueden darse casos de reinfección o sobreinfección por cepas diferentes de citomegalovirus humano.

La respuesta inmunitaria, incluye respuesta innata y adaptativa [1,2]. Dentro de la respuesta adaptativa, hay respuesta humoral con la producción de anticuerpos neutralizantes hacia las glicoproteínas virales de la envuelta y respuesta inmunitaria celular mediante linfocitos T CD4+ y CD8+, que acostumbran a controlar la infección en pacientes inmunocompetentes.

Pero en pacientes inmunocomprometidos, en ausencia de una respuesta inmunitaria efectiva, la enfermedad por citomegalovirus humano se convierte en una causa importante de morbilidad y en algunos casos de mortalidad[1]. En este tipo de pacientes el citomegalovirus humano actúa como infección oportunistas [3,4] por lo que es necesario disponer de tratamientos anti-virales para la resolución de los mismos.

Su forma de transmisión es por contacto directo a través de secreciones contaminadas (por ejemplo, saliva, lágrimas, orina, sangre, secreciones vaginales, semen, leche materna, vía transplacentaria, perinatal, a través de los órganos trasplantados de donantes seropositivos, por trasplante de células madre

hematopoyéticas, etc.) [3,5] Por este motivo son virus altamente prevalentes. Los porcentajes de individuos seropositivos en países desarrollados oscilan entre 30 y 85%, mientras que fluctúan entre 90 y 100% en países subdesarrollados[6,7,8]. Dicha seroprevalencia aumenta con la edad.

En la figura 1 se muestra esquemáticamente la estructura del citomegalovirus humano. El DNA viral está contenido dentro de una nucleocapside icosaédrica constituida de 162 capsómeros, que a su vez está recubierto por una matriz proteinácea, llamada tegumento [9]. Externamente al tegumento hay un recubrimiento o envuelta lipídica que contiene las glicoproteínas virales [10].

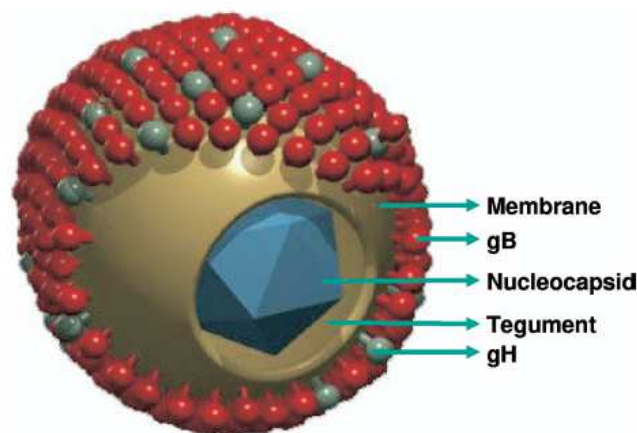


Figura 1: Imagen virtual tridimensional del citomegalovirus humano con sus principales componentes[2].

El genoma de DNA, de doble cadena lineal, es el más largo y más complejo de los *herpesviridae*, con aproximadamente 235kb que codifican aproximadamente 165 genes [11]. Al secuenciarlo se ha visto que ciertas regiones del genoma del hCMV tienen homología con ciertas secuencias del ADN celular [2].

La nucleocápside está constituida por 2 proteínas principales: mayor (153 kd) y menor (34 kd), y 2 proteínas pequeñas (de 28 y 11 kd). Posee una proteína básica (52 kd) ligada al DNA y una proteína de 38 kd presente únicamente en las partículas no infecciosas, que contribuye al ensamblaje de las partículas virales. Estas proteínas se organizan en 162 capsómeros.

El tegumento contiene la mayoría de las proteínas del virión. Las proteínas del tegumento tienen 2 funciones principales, de un lado la estructural para el ensamblaje y desensamblaje de los viriones y la función de modular la respuesta

inmune de la célula huésped frente al virus [10]. Las principales proteínas del tegumento son pp65 y pp150, que son las más inmunogénicas [12]. Otras proteínas presentes en el tegumento son UL48 y UL99.

La envoltura está formada por glicoproteínas. Ellas resultan del clivaje de una poliproteína precursora presente en las células infectadas, pero ausente en los viriones. Estas glicoproteínas de envoltura son numerosas, alrededor de 20 y están implicadas en la adhesión y penetración del virión dentro de la célula huésped [10]. Una vez el virus penetra en la célula del huésped, las glicoproteínas de la envoltura quedan en el retículo endoplásmico de Golgi y cuando se realiza el ensamblaje final de los nuevos viriones estas proteínas vuelven a incorporarse a la estructura del virus. Las glicoproteínas más abundantes son las glicoproteínas B (gB), gH, gL, gM, gN y gO [12].

1.1.1 Ciclo de replicación del citomegalovirus humano

El ciclo de replicación del citomegalovirus humano es largo con respecto a otros herpesvirus, respecto al tiempo de aparición de efectos citopáticos en cultivos celulares (*in vitro*), pero *in vivo* el tiempo de duplicación viral es de entre 12-24 horas, dependiendo del estado inmunitario del huésped [13]. Para penetrar en la célula huésped, se produce la fusión de las glicoproteínas de la envoltura del citomegalovirus humano con la membrana de la célula. Los receptores de la envoltura viral conectan con receptores complementarios en la membrana de la célula del huésped facilitando la liberación de la nucleocápsida y las proteínas del tegumento en el interior de la célula huésped iniciándose la fase lítica del ciclo viral [14]. Una vez que las proteínas del tegumento son liberadas en el citoplasma de la célula huésped, se convierten en funcionalmente activas y participan en todas las fases del ciclo viral del citomegalovirus humano [10]. Una vez el genoma viral del citomegalovirus humano accede al núcleo de la célula empieza el ciclo replicativo.

Se debe destacar que el citomegalovirus humano dispone de mecanismos para evadir el sistema inmune intrínseco del huésped, tanto el innato como el adaptativo, con diferentes proteínas del tegumento, para conseguir así su objetivo de replicación y diseminación.

El ciclo replicativo del citomegalovirus humano se divide en 3 fases, en base al tipo de genes que se expresan en cada momento[15].

-Fase inmediata-temprana (immediatly Early "IE"): entre las 0-2 horas de la infección[16]. La expresión de los genes inmediatos-tempranos es activada por la proteína del tegumento pp71 que iniciará la producción de proteínas necesarias para la replicación del genoma del citomegalovirus humano[17]. Aunque se sabe que hay algunas proteínas más implicadas en la replicación del genoma viral.

En esta fase se producen proteínas no estructurales, que regulan la expresión de otros genes virales y manipulan los procesos de la célula huésped.

-Fase temprana ("early" E): Antes de las 24 horas de la infección [16]. En esta fase se producen proteínas virales esenciales, como son, enzimas virales, proteínas relacionadas con la replicación viral incluyendo la DNA polimerasa y la helicasa-primasa.

-Fase tardía ("late"): Después de las 24 horas de la infección [16]. Esta fase se inicia una vez replicado el DNA viral. Se producen proteínas estructurales, que permitirán el ensamblaje y expulsión de los nuevos viriones fuera de la célula [10]. Las principales proteínas del tegumento implicadas en el ensamblaje y expulsión de los nuevos viriones son pp50, pp28 y UL97.

Pp50 dirige el movimiento de las cápsidas en el citoplasma, al sitio de formación de las partículas, mientras que pp28 dirige la entrada de las proteínas del tegumento y la nucleocápsida que contiene el DNA dentro de la envoltura [18][19][20].

UL97, fosforila a las proteínas del tegumento, mediante su actividad quinasa, activándolas y facilitando la replicación del DNA viral y también facilita la incorporación de las proteínas del tegumento en nuevos viriones infecciosos [18,21]. UL97 también realiza la primera fosforilación del ganciclovir[22].

Pp150, la segunda proteína más abundante del tegumento, además de ser esencial para la incorporación de las nucleocápsidas dentro de los nuevos viriones [12], mantiene la estabilidad de las nucleocápsidas en el citoplasma y también dirige su movimiento hasta su salida de la célula infectada [23].

Una vez los viriones ensamblados, se desprenden de la célula huésped por un mecanismo de exocitosis, que utiliza el sistema de transporte de la célula huésped, que incluye los nuevos viriones dentro de las vacuolas que los liberan al espacio extracelular.

Adicionalmente o alternativamente al patrón lítico de expresión de genes, el hCMV tiene la alternativa estratégica de entrar en estado de latencia, no productivo, de supervivencia. Los genomas latentes son transportados en células de la línea mieloide o médula ósea, con aproximadamente entre 2 y 13 copias del genoma viral por célula infectada [24]. El genoma viral se detecta en varios tipos celulares que incluyen monocitos/macrófagos [25,26], linfocitos [27], células de la médula ósea CD34+ [28], células dendríticas inmaduras [29] y células endoteliales [30,31]. La presencia de DNA genómico en algunos tipos celulares, representa la fagocitosis de los viriones por dichas células más que la presencia de infección. El virus puede entrar en las células, pero estas pueden producir la represión de los promotores del genoma viral con lo que no se producirían nuevos viriones [32]. El estado de permisividad de las células para la replicación viral, está directamente relacionada con el estado de diferenciación de las mismas. Las células diferenciadas permiten la replicación viral, mientras que en las células poco diferenciadas, el citomegalovirus humano puede entrar pero la célula no permite la replicación. Sin embargo estas mismas células poco diferenciadas tienen una función importante en la latencia y diseminación del virus en el organismo [32]. Bajo la influencia de factores desencadenantes, como la inmunosupresión, la inflamación, infección o situaciones de estrés [33,35], el genoma se puede expresar nuevamente, presentando periodos intermitentes de reactivación de la infección.

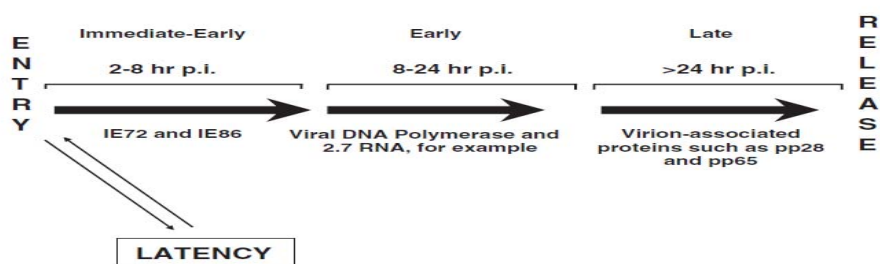


Figura 2: Expresión temporal de los genes tras la infección por el citomegalovirus humano (hCMV). [36]

1.2 hCMV EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

La inmunosupresión después del trasplante de órgano sólido confiere una especial susceptibilidad a infecciones a este tipo de pacientes.

En el trasplante de órgano sólido el citomegalovirus humano es el patógeno viral más común que influencia la evolución del órgano tanto a corto como a largo plazo [37,38], ya que este herpesvirus ubicuo a parte de los efectos directos también produce efectos indirectos sobre el paciente y la evolución del trasplante. El período de máximo riesgo está entre el primer y el sexto mes post-trasplante y la máxima incidencia se encuentra entre el segundo y tercer mes[39].

Aproximadamente el 75% de los pacientes trasplantados de órganos sólido presentan alguna evidencia de infección activa por citomegalovirus humano durante los primeros 3 meses del trasplante, en ausencia de tratamiento antiviral profiláctico o preventivo [40]. En caso de recibir tratamiento anti-viral profiláctico, la aparición de los síntomas de replicación del citomegalovirus se puede retrasar[41].

1.2.1 Factores de riesgo para el desarrollo de hCMV

El mayor riesgo de enfermedad severa por citomegalovirus humano, aparece en aquellos casos de trasplante de órgano sólido con donante seropositivo y receptor seronegativo (D+/R-) [42,43].

Cuando el donante y receptor son seropositivos (D+/R+), el receptor puede reactivar su propio virus o ser reinfectado por una cepa procedente del donante. El riesgo de enfermedad grave por citomegalovirus humano es intermedio comparado con los D+/R-.

Otros factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad por citomegalovirus humano son el grado de inmunosupresión recibida, especialmente el uso de terapia de inducción y anti-rechazo que va a condicionar la capacidad de respuesta inmune efectiva frente al virus, la edad, co-morbilidad, co-infección y el tipo de órgano trasplantado, siendo las incidencias variables según las series [41][44]. Las infecciones y episodios de rechazo agudo favorecen la aparición de inflamación, con las consiguiente liberación de citoquinas y factores de crecimiento que van a desencadenarla reactivación del hCMV latente.

Más recientemente también se han identificado otros factores relacionados con deficiencias en la inmunidad tanto innata como humoral [45].

En la tabla número 3 se describen los factores de riesgo asociados a la enfermedad por hCMV en el trasplante de órgano sólido.

Tabla 1: Factores asociados a la enfermedad por hCMV en el trasplante de órgano sólido.

Factores	Descripción
CMV serostatus de donante y receptor	CMV D+/R-> CMV D+/R+ > CMV D-/ + > CMV D-/R- [45]
Rechazo del injerto	Tratamiento del rechazo con bolus o anticuerpos anti-timocíticos[46].
Infección por CMV activa	Elevada carga viral[42]. Cantidad total de producción de virus
Tipo de órgano trasplantado	corazón-pulmón/pulmón>Corazón> intestino delgado> páncreas> hígado> riñón[41,44].
Terapia inmunosupresora de inducción	Terapias depleccionadoras de linfocitos T. Muromoab-CD3 (OKT3), globulina anti-timocítica, alemtuzumab. [38,47].
Terapia inmunosupresora de mantenimiento	Micofenolato mofetil y corticosteroides, especialmente a dosis altas[48]. Los fármacos mTOR (sirolimus i everolimus) se relacionan con una menor incidencia de hCMV [49,50].
Infección viral concomitante	HHV-6, HHV-7[51,52].
Alteraciones del sistema inmune adaptativo.	Déficit de células T CD4+ y/o CD8+ específicas para CMV [53].
Polimorfismos genéticos del sistema inmune innato y adaptativo	Mutaciones enTLR-2, TLR-4 [54]. Deficiencia de MBL, IL-10, MCP-1, CCR-5,[54,55,56]. Expresión elevada de PD-1 en linfocitos T[57].
Otros	Retrasplante, volumen de sangre transfundida, sepsis y otros factores relacionados con la producción de TNF-α como el estrés y la cirugía.
D=donante, R=receptor, HHV= herpesvirus humano, TLR= Toll-like receptor, CCR-5= quimiocina receptora de tipo 5, MBL= Manosa binding lectina, IL-10= interleucina-10, MCP-1=proteína 1 quimiotáctica de monocitos, PD-1=cell programated death-1 TNF-α= factor de necrosis tumoral α.	

El control inmunológico del citomegalovirus humano en el paciente inmunodeprimido es complejo e implica la inmunidad innata y adaptativa [1,2], además el citomegalovirus humano tiene efectos inmunomoduladores y de evasión de la respuesta inmune del huésped.

Los mecanismos inmunomoduladores del hCMV son complejos y todavía no bien conocidos, pero se podrían dividir en estas 3 categorías:

- Alteración de la replicación celular: se ha demostrado que las células infectadas por hCMV pueden ser immortalizadas por inhibición de la apoptosis inducida por Bcl y por la supresión de las fases G1 y S del ciclo celular[58].

- Alteración de las señales celulares: el hCMV puede alterar tanto las señales intra como extracelulares, principalmente interfiriendo en el reconocimiento de antígenos. El hCMV interrumpe el desarrollo de receptores de célula T y de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHCs) de clase I y II [58,59]. Esto produce una reducción de linfocitos CD8+, que son las células primarias responsables del reconocimiento de las células infectadas.

La secreción por parte de las células T CD4+ secretan IFN-gamma, TNF- α y otras citoquinas también queda modificada[60]. Y en el caso de las células natural killer se observa una reducción de su actividad[60].

El hCMV también codifica proteínas de unión a la membrana que interrumpen el tráfico normal de linfocitos durante la respuesta inmune provocando la liberación de citoquinas que inducen quimiotaxis de neutrófilos a las zonas de infección creando un estado inflamatorio que favorece la diseminación viral[58].

- Escape inmune o resistencia de la célula infectada al sistema inmunitario: estos diferentes mecanismos desarrollados por el hCMV hacen que el sistema inmune del receptor sea incapaz de reconocer y atacar las células infectadas, persistiendo la viremia y produciendo otras manifestaciones, más allá de las específicas de las células infectadas, conocidas como los efectos indirectos.

Los linfocitos B, producen anticuerpos neutralizantes contra la glicoproteína B (gB) y la glicoproteína H (gH) [2].

Los linfocitos T desarrollan la respuesta citotóxica CD4+ y CD8+ protege frente a la replicación del virus[1,2]. La respuesta de células T se ha visto que se dirige

contra un variado rango de proteínas antigénicas del tegumento del citomegalovirus humano como son pp65, pp50, IE-1 y gB entre otras[61]. Las proteínas pp65 y pp71 tienen un papel importante en la evasión del sistema inmune del paciente inmunodeprimido como ya se ha descrito en el apartado del ciclo de replicación.

La monitorización inmunológica, de la respuesta de células T específica a CMV, se ha visto que puede ser útil para decidir la estrategia de prevención de la enfermedad más adecuada. Hay varios test disponibles, pero tienen un uso más investigacional. En pocos centros se aplican como práctica clínica habitual. La mayoría de estos test se basan en la producción de interferón-gamma, tras estimulación celular con antígenos específicos de citomegalovirus[2]. Los más utilizados son el QuantiFERON-CMV assay (Cellestis Inc, Melbourne, Australia) que está estandarizado y detecta la respuesta de células T CD8+[62]. El otro ensayo más utilizado es el ELISPOT assay que determina la respuesta de células T CD4+ y CD8+. Este test no está actualmente comercializado[63,64].

Respecto a la dinámica de crecimiento o de infección del CMV, la tasa de crecimiento del citomegalovirus humano en receptores de un trasplante de órgano no inmunizados (hCMV R-) se ha visto que es significativamente más rápido que en receptores de un trasplante que presentan una infección recurrente o reactivación(hCMV R+) por lo que es más habitual que presenten enfermedades tejido invasivas[65]. La carga viral al inicio o pico de la infección por citomegalovirus humano, se relaciona con la posibilidad de presentar enfermedad por citomegalovirus en los pacientes trasplantados de órgano sólido [42,66]. Se ha definido el concepto de "umbral de enfermedad para el citomegalovirus humano", de manera que pequeños incrementos de la carga viral por encima de 10^5 resultan en un rápido incremento de la probabilidad de desarrollar enfermedad por citomegalovirus humano [37,42]. El concepto de umbral se relaciona con los efectos directos del citomegalovirus humano, pero no se puede extrapolar a los efectos indirectos, ya que niveles bajos asintomáticos se han relacionado con esta patogenia como describiremos más adelante. El objetivo del tratamiento anti-viral

será reducir la carga viral lo más rápido posible, para minimizar los efectos directos de la enfermedad.

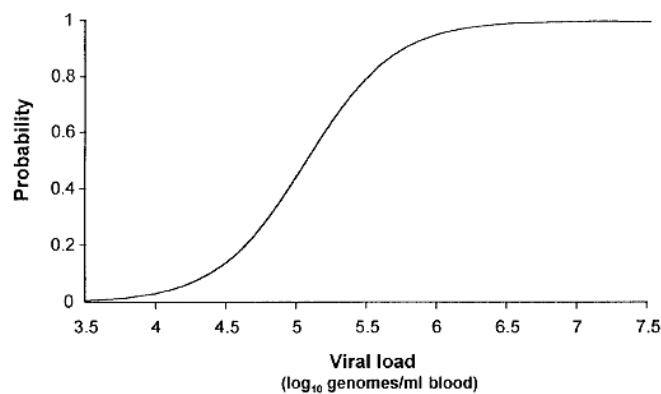


Figura 3: Interrelación entre la carga viral y la probabilidad de desarrollar enfermedad por citomegalovirus humano. [42]

1.2.2 Efectos directos e indirectos del hCMV

Las definiciones de los efectos directos causados por el citomegalovirus humano son la infección y enfermedad por citomegalovirus humano en el trasplante de órgano sólido, definidas de acuerdo con las guías existentes [67,68]. Se define la **infección por citomegalovirus** como la evidencia de replicación del virus del citomegalovirus en cualquier fluido biológico, sin signos atribuibles al virus y la **enfermedad por citomegalovirus** como la evidencia de infección con síntomas atribuibles al virus. Además la enfermedad por citomegalovirus puede categorizarse como **síndrome viral**, cuando se detecta virus en sangre y presenta fiebre, malestar general, neutropenia y/o trombocitopenia y se puede definir como **enfermedad tejido invasiva** cuando afecta a órganos (neumonía, hepatitis, retinitis, nefritis, enfermedad gastrointestinal, enfermedad del sistema nervioso central, miocarditis, pancreatitis, cistitis). La enfermedad tejido invasiva más común en el órgano sólido es la que afecta al tracto gastro-intestinal [69].

Pero el citomegalovirus humano, no solo causa morbilidad y ocasionalmente mortalidad, también se ha visto que tiene influencia a corto y largo plazo produciendo efectos indirectos que pueden contribuir a reducir la supervivencia del paciente y del injerto mediados por su habilidad de manipular el sistema inmunitario[38]. El citomegalovirus humano está asociado con una mayor

incidencia de fracaso del injerto y muerte de los receptores de un trasplante de órgano sólido (TOS), en parte por el aumento de las infecciones oportunistas y el rechazo crónico y agudo del injerto [38,70].

También la enfermedad tardía por citomegalovirus humano, que suele ocurrir tras suspender la profilaxis, también se ha visto que es un factor independiente de predicción de mortalidad en trasplante hepático y renal[71,72].

En la tabla 2 se describen los efectos indirectos generalmente asociados a citomegalovirus.

Tabla 2: Efectos indirectos asociados a citomegalovirus humano.

Efectos indirectos	Descripción
Rechazo agudo del injerto	A través de la inmunomodulación, el citomegalovirus humano puede promover el rechazo agudo [45,73]. Por el contrario, la aloestimulación y el rechazo agudo también pueden reactivar el citomegalovirus, que se acostumbra a agravar con la terapia anti-rechazo administrada.
Rechazo crónico del injerto	Las manifestaciones son diferentes en función del órgano afectado: Vasculopatía en el trasplante cardíaco [74] , bronquiolitis obliterante en el trasplante pulmonar [75], y nefropatía crónica del injerto en receptores de trasplante renal y hepático[76].
Inmunosupresión con el mayor riesgo de sufrir otras infecciones oportunistas y neoplasias.	-Infecciones fúngicas: como por ejemplo <i>Pneumocystis carinii</i> [77,78,79]. -Infecciones bacterianas: como por ejemplo <i>Nocardia spp.</i> [47,49]. -Infecciones virales: HHV-6, HHV-7 [80,81]. -Neoplasias asociadas a virus: enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (PTLD) asociada a Epstein-Barr virus [80,81]. -Carcinoma hepatocelular después de infección por HBV o HCV y cáncer de células escamosas por papilomavirus[82].
Diabetes mellitus	Se han descrito diabetes mellitus de nueva aparición después de infección por hCMV en receptores de un trasplante renal [83,83].
Otros	Aterosclerosis [10,85]. Aceleración de la recurrencia del virus de la hepatitis C (VHC) en

	trasplante hepático [86].
Mortalidad	La no administración de tratamiento se relaciona con una menor supervivencia del paciente[79,87].
HHV= herpesvirus humano	

1.3 TERAPIA FARMACOLÓGICA PARA EL hCMV.

Como ya se ha descrito en el apartado anterior, los efectos tanto directos como indirectos del hCMV en los pacientes trasplantados de órgano sólido y en general en los pacientes inmunodeprimidos pueden ser devastadores.

Por este motivo es necesario tomar medidas farmacológicas tanto de prevención de la infección por hCMV como de tratamiento en caso de producirse.

La mayoría de fármacos antivirales comercializados para el tratamiento del hCMV actúan por inhibición de la DNA polimerasa viral (UL54) [88]. Sobre esta diana actúa el ganciclovir(GCV), foscarnet(FOS) y cidofovir(CDV) y también el valganciclovir, más recientemente comercializado. En la figura 4 se describen las dianas sobre las que actúan dichos fármacos.

El foscarnet y cidofovir, en general, son fármacos de segunda elección para el tratamiento de la infección por hCMV por su mayor toxicidad y generalmente se reservan para aquellos casos en los que aparecen resistencias al ganciclovir/valganciclovir.

El mecanismo de acción del foscarnet se basa en su estructura que llega a imitar al ion pirofosfato, el cual se une específicamente al sitio del pirofosfato DNA polimerasa viral[89] como se muestra en la figura 4.

El cidofovir es un nucleótido monofosfato análogo a la citosina, que también requiere ser transformado en cidofovir difosfato (su metabolito activo) para pasar a la forma activa, pero la fosforilación es realizada por kinasas celulares [90], por lo que su activación es independiente de la infección viral. Cidofovir puede permanecer activo ante cepas de herpesvirus resistentes a diversos fármacos nucleósidos [91].

El presente trabajo de tesis se centra en los fármacos de primera línea de elección para la prevención y tratamiento de la enfermedad por hCMV, es decir, ganciclovir y valganciclovir de los que vamos a detallar en profundidad sus características físico-químicas, farmacodinámicas y farmacocinéticas.

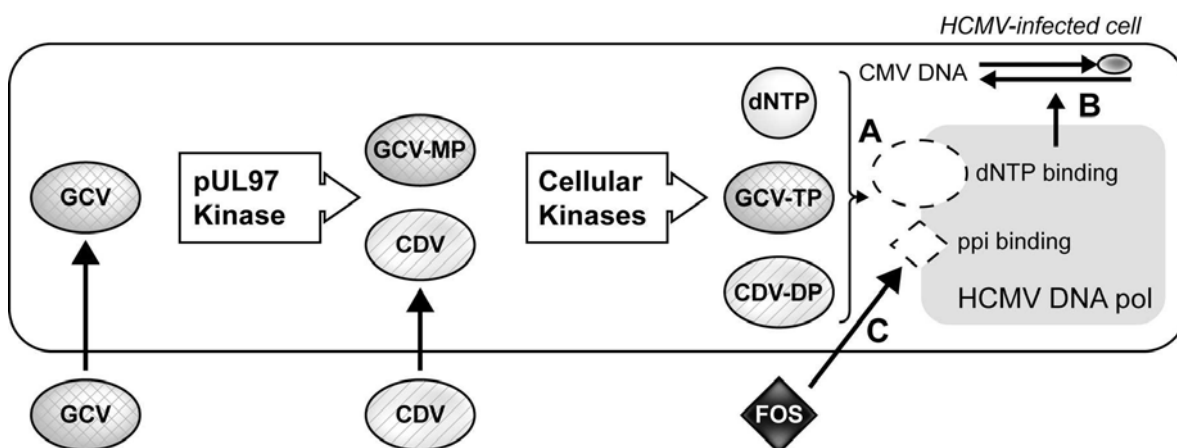


Figura 4: Mecanismo de acción de los diferentes fármacos antivirales [92].

1.1.1 Ganciclovir (GCV)

CARACTERÍSTICAS FISICO-QUÍMICAS:

El ganciclovir (Cytovene®, Roche, NJ, USA), es un compuesto polar hidrofílico con una solubilidad de 2,6mg/mL en agua a 25°C. Los pKas del ganciclovir son 2.2 y 9.4 a pH 6.5 y 7.4 respectivamente.

La sal sódica de ganciclovir es la utilizada en la formulación IV. Se presenta como polvo liofilizado con una alta solubilidad acuosa siendo esta del orden de 50 mg/mL a 25°C. Al pH fisiológico, el ganciclovir sódico no está ionizado y presenta una solubilidad aproximada de 6 mg/mL a 37°C.

En la siguiente tabla se muestra la formula estructural, molecular y peso molecular.

Tabla 3: Fórmula estructural, molecular y peso molecular las 2 formas químicas de ganciclovir.

Formulación	Formulación estructural	Formula molecular	Peso molecular
Sal sódica		C ₉ H ₁₃ N ₅ NaO ₄	277.21 Daltons
Ganciclovir		C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	255.23 Daltons

FARMACODINAMIA:

El ganciclovir es un análogo del nucleosido 2' desoxiguanosina que actúa como un inhibidor competitivo con la desoxiguanosin trifosfato (dGTP) utilizada por la DNA polimerasa viral para su replicación (producto del gen UL54)[93]. Para la activación del ganciclovir es necesaria una primera fosforilación realizada por la kinasa viral codificada por UL97 seguida de dos fosforilaciones más realizadas por kinasas celulares[94].

El ganciclovir-trifosfato (ganciclovir-TP) inhibe la replicación viral al competir con la desoxiguanosina-TP como sustrato del DNA polimerasa del virus (producto del gen UL54). La ralentización o la interrupción de la extensión de la cadena de DNA inhiben la replicación viral, debido a la menor incorporación de dGTP y a la incorporación de ganciclovir-monofosfato. Consecuentemente se reduce la incorporación de dGTP por lo que se producen fragmentos de DNA virales cortos [95]. Esto impide la expresión de genes necesarios para la replicación y la síntesis de proteínas virales, inhibiéndose la progenie viral [96,97].

La prolongada semivida intracelular de ganciclovir-TP en las células infectadas por el hCMV, potencia la eficacia de ganciclovir frente al hCMV. Una vez formado, el ganciclovir-TP es bastante estable y se mantiene durante horas en la célula infectada, lo que hace que su actividad antiviral sea prolongada (semivida intracelular 6-12 horas) [94,98].

La actividad antiviral se define en términos de IC50, que es la concentración de ganciclovir a la que la replicación viral es inhibida un 50%. La concentración *in vitro* de ganciclovir que produce la IC50 varía desde 0.1 hasta 1.6 mg /L[99]. El ganciclovir también inhibe la DNA polimerasa celular, pero para ello su concentración debe estar ser de 7 a 12 veces mayor que la que inhibe la DNA polimerasa viral [94], lo que indica que ganciclovir se fosforila preferentemente en las células infectadas por el virus. Sin embargo, las células de médula ósea son especialmente sensibles a ganciclovir [99]. El mecanismo de acción del ganciclovir es similar al aciclovir, pero es más potente, siendo su IC50, 26 veces inferior a la del aciclovir[99].

FARMACOCINÉTICA:

La farmacocinética del ganciclovir es lineal entre las dosis de 1 a 6 g vía oral y entre las dosis de 1 a 5 mg/Kg vía IV[96,100].

Cuando se administra por vía oral presenta una baja absorción a nivel de la mucosa intestinal, con una biodisponibilidad de aproximadamente el 5% en ayunas, la cual aumenta ligeramente si se administra en presencia de alimento a valores de 6-9% [99,101]. Una vez absorbido, el ganciclovir se une muy poco a proteínas plasmáticas, con porcentajes del orden del 1-2% para un rango de concentraciones desde 0,5 a 51 mg/L[101]. El volumen de distribución del ganciclovir en estado estacionario (V_{ss}) se ha estimado en 0.68 ± 0.16 L/kg ($n=114$). El V_{ss} medio estimado en la población de pacientes con función renal normal, oscila desde 32.8 a 44.5L/1.73m² (rango 17-59.1L/1.73m²). El volumen de distribución medio en el compartimento central (V_c) es de 15.25L/1.73m² (rango 11-22.5L/1.73m²) [102,103]. El ganciclovir atraviesa la barrera hematoencefálica [103].

El ganciclovir se elimina inalterado por excreción renal principalmente por filtración glomerular y en menor medida por secreción tubular activa. El aclaramiento de ganciclovir está directamente relacionado con el aclaramiento de creatinina (CL_{CR}) [97,104]. La disposición del ganciclovir en el organismo es biexponencial, con una semi-vida de eliminación estimada a partir de la fase monoexponencial terminal ($t_{1/2\beta}$) de aproximadamente 4 horas en pacientes voluntarios sanos y pacientes con SIDA[101], pero en pacientes con disfunción renal entre leve ($CL_{CR} \leq 70$ mL/min) y severa ($CL_{CR} \leq 10$ mL/min), la $t_{1/2\beta}$ aumenta de 1.4 a 20 veces, respectivamente y las respectivas exposiciones al fármaco (dadas por el valor bajo la curva de concentraciones séricas vs tiempo o AUC) también aumentan de 1.8 a 15 veces respectivamente[105], por lo que es un fármaco que necesita individualización de la dosis según la función renal. Por el contrario los valores de concentración plasmática máxima (C_{max}) se ven poco afectados. En pacientes de hemodiálisis se elimina aproximadamente de un 40 a un 50% del ganciclovir en una sesión de aproximadamente 4 horas.[105,106,107].

EFFECTOS ADVERSOS y TOXICIDAD:

Los efectos adversos del ganciclovir afectan al sistema reproductivo, hematopoyético, renal e intestinal. La magnitud de estos efectos adversos depende del grado de exposición al fármaco.

Estudios en animales han demostrado que el ganciclovir es teratogénico, mutagénico y cancerígeno a dosis de 50 a 100 veces superiores a las aplicadas en clínica por lo que no debería ser administrado en mujeres que estén en periodo de lactancia o en mujeres y hombres en edad fértil, sin utilizar métodos anticonceptivos hasta 90 días después de suspender el tratamiento [101].

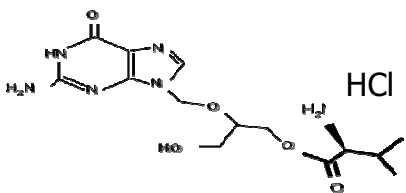
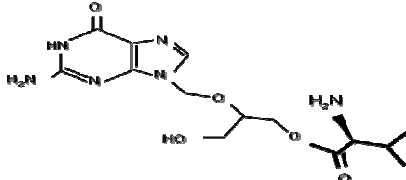
Exposiciones prolongadas, a dosis altas, pueden dar problemas gonadales, ganglios linfáticos esplénicos y atrofia del timo [108]. También se ha observado, incluso a dosis terapéuticas, leucopenia, anemia y plaquetopenia. En general, estos efectos aparecen en menor proporción en los pacientes tratados con ganciclovir oral[109]. Los efectos mielotóxicos, a las dosis terapéuticas, suelen ser manejables en la mayoría de los casos, requiriéndose en ocasiones, fármacos estimulantes de las colonias de granulocitos, siendo baja la proporción de pacientes a los que hay que interrumpirles el tratamiento debido a leucopenia o neutropenia. Esto puede ocurrir principalmente en pacientes con SIDA y retinitis por hCMV que reciben dosis más altas[110,112]. Por otra parte, a nivel gastrointestinal puede causar diarrea, náuseas y vómitos.

1.1.2 Valganciclovir (VGC)**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS:**

El valganciclovir (Valcyte®, Roche, NJ, USA) es el clorhidrato del L-valil ester del ganciclovir. Es un polvo blanco cristalino de alta solubilidad acuosa, siendo ésta del orden de 70 mg/mL a 25°C y a pH=7. El pKa del HCl valganciclovir es de 7.6 y en solución acuosa su estabilidad es mayor a pH<3.8.

En la siguiente tabla 4 se muestra la fórmula estructural, molecular y el peso molecular.

Tabla 4: Formula estructural, molecular y peso molecular del valganciclovir.

Formulación	Formulación estructural	Formula molecular	Peso molecular
Clorhidrato		$C_{14}H_{22}N_6O_5 \cdot HCl$	390.83 Daltons
Valganciclovir		$C_{14}H_{22}N_6O_5$	354.3 Daltons

FARMACODINAMIA:

Después de la administración oral, el VGC es rápidamente absorbido a través de los transportadores intestinales de péptidos (PEPT1 y PEPT2) [113] y rápidamente hidrolizado a ganciclovir, fármaco activo, a través de las esterases intracelulares de la mucosa intestinal y hepática.

FARMACOCINÉTICA:

Cuando se administra en presencia de comida, las exposiciones alcanzadas son proporcionales a las dosis administradas en el rango de dosis de 450 a 2625 mg/d[114]. Dentro de este intervalo de dosis no se ha observado acumulación del fármaco, posiblemente debido a su corta semivida y a las pautas de administración propuestas de 12 y 24 horas. La biodisponibilidad del ganciclovir administrado como su profármaco, valganciclovir oral, es aproximadamente del 60% en todas las poblaciones adultas estudiadas (voluntarios sanos, SIDA, retinitis, trasplante de órgano sólido)[115], siendo aproximadamente 10 veces superior a la obtenida con ganciclovir oral en cápsulas[116].

La exposición a valganciclovir es muy baja y transitoria tras su administración tanto en pacientes con SIDA y retinitis por hCMV [114], como en pacientes trasplantado hepáticos[115], de tal forma que su exposición (AUC) únicamente alcanza valores del orden del 1-2% de los observados para el ganciclovir formado[101]. Tras la administración de 875 mg de valganciclovir en presencia de alimento, la AUC_{0-24h} del valganciclovir fue de 0.39 (mg/L)·h mientras que la del ganciclovir fue de 24.8

(mg/L)·h[114]. La administración de valganciclovir con comida grasa aumenta la magnitud de su absorción del orden del 24 al 30% (AUC_{0-24h}), los valores de C_{max} aumentan en un 14%, sin que se modifique el valor de T_{max} en que se alcanza la concentración plasmática máxima (T_{max})[114].

EFFECTOS ADVERSOS y TOXICIDAD:

En general, los perfiles de seguridad y tolerabilidad del valganciclovir son similares a los del ganciclovir intravenoso y oral, siendo consistentes con la similitud de los perfiles farmacocinéticos hallada tras la administración de valganciclovir oral vs ganciclovir IV.

1.1.3 Estudios clínicos de eficacia y farmacocinética

El Ganciclovir fue el primer fármaco anti-viral aprobado para el tratamiento de la infección y enfermedad por citomegalovirus humano y fue entre los primeros fármacos aprobados para el tratamiento de infecciones oportunistas en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Inicialmente el ganciclovir IV se autorizó en 1989 para retinitis por hCMV en pacientes con SIDA a una dosis de 5 mg/Kg/12h durante 3 semanas seguido de una dosis de mantenimiento de 5 mg/Kg/día [109].

Posteriormente, se realizaron los estudios para la indicación del tratamiento de la infección por citomegalovirus humano en trasplante de órgano sólido a una dosis de 5 mg/Kg/12h durante 2-4 semanas[117].

Dado los efectos devastadores (directos y especialmente indirectos) que podía tener el hCMV en los pacientes inmunodeprimidos, los esfuerzos se dirigieron hacia el desarrollo de estrategias de prevención de la enfermedad por hCMV.

Sin embargo, en el caso del ganciclovir IV la administración intravenosa a largo plazo del fármaco era logísticamente compleja requiriendo ingreso hospitalario, además los riesgos derivados de los accesos periféricos, tanto infecciones como trombosis[118].

Para evitar estos inconvenientes, en el año 1995 se comercializó el ganciclovir oral (Cytovene®, Roche, NJ, USA) en forma de cápsulas.

Esta presentación supuso un avance para la profilaxis y la terapia de mantenimiento frente a hCMV. El ganciclovir oral se aprobó para la indicación de la prevención de la retinitis primaria y secundaria en pacientes con SIDA. En el estudio de Spector et al [119], se demostró que ganciclovir oral reducía el riesgo de enfermedad por hCMV en un 49%. Respecto a la terapia de mantenimiento de la retinitis por hCMV con ganciclovir oral a las dosis de 1g/8h, se demostró que era equivalente a ganciclovir IV 5 mg/Kg/día, al no diferir significativamente en el tiempo de progresión de la retinitis por hCMV de 62 a 57 días, respectivamente [109]. El ganciclovir oral también demostró su eficacia para la prevención de la enfermedad por hCMV en trasplante de órgano sólido. En el estudio realizado por Gane et al [120] en pacientes trasplantados hepáticos, se demostró que ganciclovir oral 1g/8h vs placebo durante 98 días reducía significativamente la incidencia de enfermedad por hCMV del 19% al 5%. El ganciclovir oral a la dosis de 1g/8h durante 8 semanas también se mostró efectivo para reducir la incidencia de la infección y enfermedad por hCMV en pacientes recibiendo tratamiento anticipado [121].

La limitación del ganciclovir oral, fue su baja biodisponibilidad, del orden del 6-9% [115] que limitaba la exposición sistémica conseguida y además requería la administración de entre 6-12 cápsulas diarias (en administración 3 veces al día), en un grupo de pacientes ya de por sí polimedicados. Las concentraciones plasmáticas subóptimas de ganciclovir oral también se relacionaron con un aumento de resistencias, especialmente mutaciones en el gen UL97 y en menor medida en el gen UL54 que confieren resistencia al ganciclovir [122,123].

Respecto a los estudios farmacocinéticos, en pacientes con retinitis por hCMV y SIDA, tras la administración oral de 1g/8h o 5 mg/kg IV la C_{max} fue de 1.18 y 8.27 µg/ml, la C_{min} fue de 0.23 y <0.05 µg/ml y la AUC de 15.4 y 22.1 (µg/ml).h, respectivamente [124].

Pescovitz et al [125] realizaron un estudio en pacientes de trasplante de órgano sólido y hemodiálisis administrando ganciclovir oral, en base a un algoritmo de dosis basado en el aclaramiento de creatinina, observándose que la

biodisponibilidad era similar a la obtenida en pacientes con SIDA y retinitis y que el algoritmo de dosis propuesto era correcto para obtener concentraciones inhibitorias del hCMV para pacientes con $CL_{creat} \geq 50$ mL/min y para pacientes en hemodiálisis.

Dada la baja exposición a ganciclovir, el ganciclovir oral no se considera efectivo para el tratamiento de la infección y enfermedad por hCMV.

Posteriormente, fue desarrollado el valganciclovir (Valcyte®, Roche, NJ, USA), un profármaco, el L-valil ester de ganciclovir autorizado en el año 2001 por la FDA.

El fármaco desarrollado presentaba una biodisponibilidad de hasta 10 veces superior al ganciclovir oral [116] y similar a la obtenida con ganciclovir iv. En el estudio de Jung et al [116] en 18 pacientes con SIDA y hCMV seropositivos se administró en un diseño cruzado, 1 dosis única de valganciclovir 360 mg, ganciclovir oral 1000 mg y una infusión de ganciclovir 5 mg/kg de 1 hora de duración. Las AUC medias obtenidas fueron de 10.8 ± 1.9 , 3.8 ± 1.2 y 25.1 ± 3.8 ($\mu\text{g/mL}$).h, respectivamente.

Tras la administración oral el máximo de concentración fue superior y a un tiempo inferior con valganciclovir con una C_{max} de 2.98 ± 0.77 $\mu\text{g/mL}$ a T_{max} de 1 ± 0.3 h versus C_{max} 0.47 ± 0.17 $\mu\text{g/mL}$ a una T_{max} de 2.2 ± 1 h[116].

Brown et al [114] en un estudio de dosis múltiples en 39 pacientes con SIDA y hCMV seropositivos, administró 450, 875, 1725 y 2625 mg de valganciclovir. En el citado estudio se observó que la AUC de ganciclovir 875 mg fue de 24.8 ($\mu\text{g/mL}$).h, que es equivalente a la obtenida con una dosis de ganciclovir IV 5mg/Kg y también se demostró que la administración junto con alimentos mejoraba la absorción.

En un estudio posterior Czock et al[105]estudiaron en pacientes con SIDA y hCMV y voluntarios sanos el efecto de la disfunción renal sobre la farmacocinética del ganciclovir tras la administración de una dosis única de valganciclovir oral 900 mg, demostrando que el aclaramiento de ganciclovir estaba correlacionado con el aclaramiento de creatinina y por tanto era necesario ajustar la dosis al mismo y que no habían diferencias en la farmacocinética entre pacientes con SIDA y voluntarios sanos.

La primera indicación aprobada del valganciclovir fue para el tratamiento de inducción y mantenimiento de la retinitis por hCMV en pacientes con SIDA. Los

estudios fase II/III realizados fueron 2. En el primer estudio (WV15376), 160 pacientes con SIDA recién diagnosticados de retinitis por hCMV se aleatorizaron (1:1) a recibir valganciclovir 900mg/12h durante 21 días seguido de 900mg/día durante 7 días más versus ganciclovir 5 mg/kg cada 12 horas iv durante 21 días seguido de ganciclovir 5mg/kg cada día durante 7 días adicionales. Después de las 4 semanas de tratamiento, los resultados de eficacia entre valganciclovir oral y ganciclovir IV fueron comparables (progresión de la retinitis 10% en cada grupo, estabilización en 72 y 77% de los paciente, respectivamente) [112]. En este estudio, las AUC_{12h} de ganciclovir a las dosis de inducción fueron de 28.6±9.0 y 32.8±10.1 (µg/ml).h, para el ganciclovir IV 5mg/12h y el valganciclovir oral 900 mg/12h, respectivamente. A las dosis de mantenimiento las AUC_{24h} fueron de 30.7±7.7 y 34.9±10.1 (µg/ml).h, para el ganciclovir IV 5mg/día y el valganciclovir oral 900 mg/día, respectivamente, es decir, fueron incluso ligeramente superiores en los pacientes tratados con valganciclovir oral. En el segundo estudio (WV15705) se trataron 212 pacientes con SIDA que previamente habían sido tratados de retinitis. A los pacientes con retinitis quiescente en el momento de la inclusión, se les suministró una dosis de mantenimiento con valganciclovir 900 mg/día durante 1 año. Por otro lado, en caso de reactivación se les administraba valganciclovir 900mg/12h durante 21 días, seguido de de valganciclovir 900 mg/día hasta completar 1 año de tratamiento. Con un seguimiento de 18 meses, solo el 17% de los pacientes presentó progresión de la enfermedad, 6% desarrollaron enfermedad contra-lateral, 17% presentaron algún malfuncionamiento visual y sólo el 2% de los pacientes enfermedad por hCMV extraocular [110].

En paralelo se iniciaron los estudios para la indicación de prevención del citomegalovirus humano en trasplante de órgano sólido.

En el estudio de registro (PV16000) se incluyeron 364 pacientes receptores de un trasplante de órgano sólido de alto riesgo (CMV D+/R-) que fueron aleatorizados 2:1 a recibir valganciclovir 900mg/d o ganciclovir oral 1000 mg/d durante 100 días (iniciando el tratamiento dentro de los 10 días post-trasplante y dosis ajustada a función renal). La incidencia de enfermedad por citomegalovirus a los 6 y 12 meses post-trasplante para el grupo de valganciclovir y ganciclovir oral fue de 12.1% vs 15,2% y 17.2%vs 18.4%, respectivamente. Por lo que se demostró que

los resultados de eficacia eran similares en ambos grupos de tratamiento. Se observó que la viremia durante la profilaxis era inferior en el grupo de valganciclovir (2.9% vs 10.4%). Respecto a seguridad, el perfil de seguridad fue similar en ambos grupos, aunque observándose mayor incidencia de neutropenia en el grupo de valganciclovir (8.2% vs 3.2%) [73]. La mayoría de casos de enfermedad tardía por hCMV aparecieron entre los 4 y 6 meses post-trasplante, apareciendo más precozmente en el grupo de ganciclovir oral. La aparición de resistencias fue baja, no habiendo ningún caso en el grupo de valganciclovir.

Al hacer el análisis por tipo de trasplante, se observó en el grupo de trasplante de hígado, que los pacientes del grupo de valganciclovir tenían una mayor incidencia de enfermedad tejido invasiva, por lo que cuando se aprobó la indicación de prevención de la enfermedad por hCMV en trasplante de órgano sólido, en el año 2003, la FDA lo autorizó sólo para riñón, páncreas y corazón. Aunque en otros muchos países (como es el caso de España) está también aprobado para trasplante de hígado en caso de CMV D+/R-.

Respecto a los estudios farmacocinéticos con valganciclovir, en el estudio realizado en 28 pacientes trasplantados de hígado y publicado por Pescovitz en el año 2000[115], se demostró la equivalencia entre la exposición de una dosis única de VGCV oral (450 mg) y GCV oral (1gr/8h) y entre una dosis única de VGVC oral (900 mg) y una dosis única de GCV IV (5mg/kg). En el citado estudio la exposición obtenida tras una dosis única de valganciclovir 450mg no era inferior a la obtenida con ganciclovir 1g/8h (AUC: 21.1($\mu\text{g}/\text{mL}$).h vs 20.7($\mu\text{g}/\text{mL}$).h) y la exposición obtenida con una dosis única de valganciclovir 900mg no era superior a la obtenida con ganciclovir 5mg/kg IV (AUC: 41.7 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).h vs 48.2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).h) [115].

En adultos receptores de un trasplante de órgano sólido del estudio PV16000, la exposición a ganciclovir en estado estacionario (dosis múltiples), después de administrar valganciclovir 900 mg/día, es aproximadamente 1,7 veces la que se obtiene con ganciclovir oral 1gr administrado 3 veces al día(AUC_{0-24h}=46.3($\mu\text{g}/\text{mL}$).h vs 28($\mu\text{g}/\text{mL}$).h)[126]. En el sub-análisis por tipo de órgano trasplantado tampoco se observaron diferencias en la exposición [126].

En general, en los estudios farmacocinéticos en pacientes sanos o con retinitis por hCMV en pacientes con SIDA frente a pacientes trasplantados de órgano sólido podía observarse que las AUCs a dosis de profilaxis, eran superiores en pacientes trasplantados comparado con voluntarios sanos y pacientes con SIDA posiblemente debido a una mayor eliminación terminal del ganciclovir, a la vez posiblemente derivada del uso de fármacos inmunosupresores en muchos casos nefrotóxicos [127]. El aumento de esta exposición a ganciclovir también podía provocar aumento de frecuencia de reacciones adversas, como por ejemplo las hematológicas.

En la siguiente tabla 5 se describen las principales características farmacocinéticas de ganciclovir y valganciclovir de acuerdo con las respectivas informaciones de producto.

Tabla 5: Principales características farmacocinéticas del ganciclovir oral, IV y del valganciclovir en base a las informaciones de producto de Roche.[128,129,130].

Principales características farmacocinéticas	Ganciclovir oral (ganciclovir)	Ganciclovir IV (ganciclovir sódico)	Valganciclovir oral (valganciclovir HCl)
Biodisponibilidad	5-9%	N/A	60%
Cmax (mg/mL)	1.18	9	5.6
AUC0-24h pac sanos y SIDA (µg/mL).h	12.3-19.1	26.5±5.9	29.1±9.7
t1/2 terminal pac sanos y SIDA (h)	4.8±0.9	3.81±0.71	4.08±0.76
AUC0-24h TOS (µg/mL).h	24.9-31.3	48.2±17.3	40.2-48.8
t1/2 terminal TOS (h)	6.48±1.38	N/D	8.56±3.62

N/A: no aplica N/D: no realizado.

Actualmente el ganciclovir oral ya no se encuentra comercializado en muchos países, por haber sido reemplazado por el valganciclovir oral.

En las tablas 6 y 7 se detallan las recomendaciones de dosis en base a la función renal según la información del fabricante de ganciclovir intravenoso y valganciclovir, tanto para inducción como mantenimiento.

Tabla 6: Dosificación del ganciclovir intravenoso, ajustado a la función renal del paciente de acuerdo con la ficha técnica [129].

Aclaramiento creatinina	Dosis tratamiento o inducción	Dosis profilaxis o mantenimiento
>70 mL/min	5 mg/kg cada 12h	5 mg/kg cada día
50-69 mL/min	2.5 mg/kg cada 12h	2.5 mg/kg cada día
25-49 mL/min	2.5 mg/kg cada día	1.25 mg/kg cada día
10-24 mL/min	1.25 mg/kg cada día	0.625 mg/kg cada día
< 10 mL/min	1.25 mg/kg 3 veces por semana tras la HDI	0.625 mg/kg 3 veces por semana tras la HDI

Tabla 7: Dosificación del valganciclovir oral, ajustada a la función renal del paciente de acuerdo con la ficha técnica [130].

Aclaramiento creatinina	Dosis tratamiento o inducción	Dosis profilaxis o mantenimiento
≥60 mL/min	900 mg/12h	900 mg/día
40-59 mL/min	450 mg/12h	450 mg/día
25-39 mL/min	450 mg/día	450 mg cada 2 días
10-24 mL/min	450 mg cada 2 días	450 mg 2 veces a la semana
< 10 mL/min	Ganciclovir iv: 2.5mg/kg cada 2 días	-

1.4 PREVENCIÓN y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD POR CITOMEGALOVIRUS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO (TOS).

1.4.1 Prevención de la enfermedad por hCMV en el TOS

La importancia de la prevención de la enfermedad por citomegalovirus, es que se ha visto que reduce la incidencia y gravedad tanto de los efectos directos como los indirectos causados por el mismo [79,131,132].

Para la prevención del citomegalovirus humano, se han usado 2 estrategias principalmente, que son la profilaxis antiviral y la terapia anticipada (“preemptive”) [43].

En la **profilaxis antiviral**, la estrategia consiste en administrar a todos los pacientes de riesgo un fármaco anti-viral por un periodo de entre 3 y 6 meses. La duración de la terapia dependerá del grado de inmunosupresión recibida por el paciente, incluyendo la administración de anticuerpos anti-linfocitarios. La profilaxis antiviral se recomienda para todos los pacientes considerados de riesgo que incluye en todos los órganos los receptores CMV D+/R- y CMV D+/R+ dependiendo del tipo de órgano. [133,134]. La terapia debe ser iniciada post-trasplante inmediato, aunque en algunos centros se retrasa hasta 2 semanas post-trasplante ya que los resultados de un estudio realizado sugieren que el retrasar el inicio permite el desarrollo una adecuada inmunidad específica a hCMV con lo que el riesgo de enfermedad tardía por CMV disminuye[135].

Los fármacos más utilizados para la profilaxis con eficacia demostrada son valaciclovir (solo en trasplante renal), ganciclovir oral e IV y valganciclovir oral. Cidofovir y foscarnet no son fármacos de primera línea por su perfil de toxicidad renal[45]. También inicialmente se utilizó aciclovir, fuera de indicación de ficha técnica, aunque está en desuso por las elevadas dosis que deben administrarse y la baja exposición que se obtiene. En algunos órganos se han utilizado preparaciones con inmunoglobulinas, tanto inmunoglobulinas específicas para hCMV(CMVIg) o inmunoglobulinas intravenosas inespecíficas (IVIg) pero hay pocos

estudios [136,137,138] y deberían hacerse más estudios aleatorizados y ciegos para confirmar el beneficio de añadir inmunoglobulinas al régimen de profilaxis.

En la **terapia anticipada**, los pacientes son monitorizados para detectar evidencia de reactivación del citomegalovirus. Tan pronto se detecta replicación viral, se administran fármacos anti-virales para prevenir la progresión de infección a enfermedad por citomegalovirus y para el seguimiento evolutivo [66,139].

Los test de laboratorio utilizados para la determinación de citomegalovirus humano más habitualmente utilizados son la antigenemia pp65 y las técnicas moleculares basadas en la detección de DNA y RNA.

El ensayo de la antigenemia pp65 es un test semi-cuantitativo, basado en la detección de células infectadas en sangre periférica.

Existen varios test moleculares que pueden detectar DNA o RNA de forma cualitativa o cuantitativa mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mayoría de tests se realizan en plasma o sangre total de forma semanal durante los primeros 3 meses post-trasplante [134]. Existen discrepancias y falta de estandarización entre diferentes centros respecto a este tipo de técnicas.

Para ambas técnicas, cada centro debe validarlo y fijar el valor base a partir del cual se iniciará el tratamiento preventivo y hacer el seguimiento de la evolución del mismo. Las guías recomiendan mantener el tratamiento hasta conseguir 1 o 2 resultados negativos como mínimo [134,140]. Algunas guías también sugieren continuar realizando monitorización de la viremia o instaurar profilaxis secundaria, una vez finalizado el tratamiento [134].

Los tratamientos más habitualmente utilizados son valganciclovir oral, seguido de ganciclovir IV a dosis plenas [133].

De ambas estrategias de prevención, la profilaxis antiviral primaria parece ser más efectiva que la terapia anticipada en la prevención de los efectos indirectos del citomegalovirus [79,131]. Las guías también recomiendan el uso de profilaxis sobre la terapia preventiva en aquellos pacientes de mayor riesgo, es decir, CMVD+/R- [45,134].

También hay que decir que el tratamiento anticipado no se ha estudiado a fondo en algunas poblaciones como el trasplante de pulmón, intestinal o pediátrico.

Ambas estrategias de prevención del citomegalovirus humano tienen ventajas e inconvenientes que se describen brevemente en la siguiente tabla.

Tabla 8: Ventajas e inconvenientes de la profilaxis y la terapia anticipada.

Criterio	Profilaxis antiviral	Terapia anticipada
Eficacia	Si, en ensayos aleatorizados con grandes poblaciones	Si, en ensayos más pequeños. Menor en D+/R-
Simplicidad	Fácil de coordinar	Más difícil de coordinar, por frecuencia de toma de muestras.
Infección tardía por CMV	Podría ser un problema potencial.	Menos frecuente que en profilaxis
Coste	Alto, por el coste de la medicación	Alto, por el coste de los test de laboratorio
Toxicidad	Mayor toxicidad (principalmente mielosupresión) por la mayor duración del tratamiento.	Menor, por menor duración del tratamiento.
Efectos indirectos	Efecto positivo, basado en meta-análisis, y ensayos comparativos	Información limitada.
Otros		Puede no detectar todos los casos de enfermedad, especialmente algunos tejido invasivos (gastrointestinal o retina) con indetectable carga viral–enfermedad compartimentalizada [133].

1.4.2 Tratamiento de la enfermedad por hCMV en el TOS

El tratamiento de elección clásico para la enfermedad por citomegalovirus en el paciente trasplantado de órgano sólido, tanto para el síndrome viral como enfermedad tejido invasivo, ha sido siempre el ganciclovir IV. Otros tratamientos como el ganciclovir oral o el aciclovir o valaciclovir están desaconsejados por no conseguir suprimir la replicación viral necesaria en caso de enfermedad [134].

Más reciente tras la introducción del valganciclovir oral, se ha visto que tiene una eficacia similar al ganciclovir IV por lo que lo está desplazando, al menos en aquellos casos no graves y en los que no se observa afectación intestinal o problemas de absorción intestinal [141].

En los estudios preliminares, como el realizado en el presente proyecto de tesis, se realiza un tratamiento secuencial, es decir, iniciar tratamiento con ganciclovir IV y pasar a valganciclovir oral coincidiendo con la mejora de la clínica. En nuestro estudio piloto, se demuestra que la exposición que se obtiene a ganciclovir tras el valganciclovir oral no es inferior a la obtenida con ganciclovir IV [142].

Posteriormente, Roche sponsorizó el estudio internacional, multicéntrico, aleatorizado VICTOR con 321 pacientes trasplantados de órgano sólido presentando enfermedad por citomegalovirus. En el mismo se demostró que valganciclovir oral es igual de eficaz y seguro que el ganciclovir IV para el tratamiento de la enfermedad por citomegalovirus [141, 143].

En caso de efectos adversos como leucopenia, se debe intentar mantener dosis de valganciclovir oral o ganciclovir IV, para conseguir exposiciones adecuadas. En la medida de lo posible se debe valorar las opciones de reducir las dosis de fármacos inmunosupresores y en casos severos valorar la posibilidad de administrar factor estimulante de colonias de granulocitos [134].

Respecto a la duración del tratamiento antiviral, actualmente las guías recomiendan individualizar el tratamiento en base a los resultados de la monitorización clínica y virológica semanal con una duración no inferior a 2 semanas y observando negativización de la viremia o antigenemia [133, 140, 141]. En los pacientes de alto riesgo, se recomienda obtener 2 muestras

consecutivas negativas, con una separación de al menos 1 semana entre ellas antes de suspender el tratamiento.

En algunos centros de trasplante, se realiza la llamada profilaxis secundaria con valganciclovir oral a dosis profilácticas, durante un periodo de entre uno y tres meses, si según criterio de los investigadores existen criterios de riesgo para la recurrencia de la infección por citomegalovirus humano [133,143]. Los criterios de recurrencia serían infección primaria por hCMV, alta carga viral basal, persistencia de viremia en el momento de inicio de la profilaxis secundaria, enfermedad multiorgánica, trasplante de órganos de mayor riesgo, y aumento de la inmunosupresión por episodios de rechazo agudo[143,144,145]. Otra posible opción es realizar vigilancia virológica, tras la suspensión del tratamiento.

En casos de recurrencias de enfermedad por citomegalovirus se recomienda prolongar la profilaxis secundaria [134].

En los casos de enfermedad compartimentada, con afectación de órganos y sin viremia detectable, la antigenemia o viremia son de limitado uso como guías en la resolución de la enfermedad. En estos casos, se requiere la prolongar el tratamiento y evaluar la respuesta al tratamiento en base a la respuesta clínica e histológica[140].

Tanto si se administra valganciclovir oral como si se administra ganciclovir IV es muy importante conseguir unos niveles de exposición que sean terapéuticos. Unos niveles infra-terapéuticos pueden promover el desarrollo de resistencias [146], mientras que unos niveles demasiados altos podrían favorecer la aparición de efectos tóxicos [123]. Es muy importante la monitorización de la función renal y el ajuste de las dosis de tratamiento en base a la misma.

1.4.3 Tratamiento de las resistencias en la enfermedad por hCMV en el TOS.

Durante las 2 primeras semanas de tratamiento de la enfermedad por citomegalovirus humano, la antigenemia o DNAemia pueden aumentar en más de dos terceras partes de los pacientes y esto no representa necesariamente la presencia de resistencias [140].

Las resistencias deben sospecharse si a partir de la segunda semana de tratamiento se observa que la carga viral es estable o progresiva (resistencia vírica) o la persistencia de síntomas (resistencia clínica).

La resistencia clínica no va necesariamente relacionada con la resistencia vírica, ya que puede ser debida a factores relacionados con la respuesta inmune del paciente [147], o por no alcanzan niveles adecuados de fármaco anti-viral. En estos casos se recomienda hacer niveles de ganciclovir y ver el estado de inmunidad específico frente a citomegalovirus humano. También reducción de inmunosupresión o cambios en el tratamiento inmunosupresor pueden ayudar a resolver la resistencia clínica, particularmente en aquellos que no tienen una exposición prolongada a fármacos anti-virales[140]. El tratamiento con everolimus y sirolimus está relacionado con una baja incidencia de enfermedad por citomegalovirus[148], por lo que se propone como alternativa para el tratamiento en caso de pacientes con infección por hCMV resistente a ganciclovir[149].

La definición actual de la resistencia al ganciclovir en estudios in vitro es CI50 >1,5 µg/ml (6,0 µM) y dependen de la existencia de mutaciones en su genoma y pueden ser demostradas por genotipado o fenotipado. Lo más rápido es hacer el genotipado, que consiste en amplificar unas determinadas regiones del genoma viral, seguido de secuenciación [92].

El fenotipado, solo se recomienda para estudio de sensibilidad "in vitro", pero tienen el inconveniente de que son más largos y laboriosos.

Los principales factores que favorecen la aparición de resistencias son la no existencia de inmunidad previa (hCMV D+/R-), exposición prolongada a fármacos anti-virales, especialmente si es a concentraciones subterapéuticas, en tratamientos intermedios y en presencia de altas cargas virales e inmunosupresión intensa [140]. El órgano con mayor incidencia de resistencias es el trasplante de pulmón [150,151].

Las resistencias se dan entre un 5-10% de los casos [122,152]. Y son cada vez más frecuentes en los casos de enfermedad tardía, que suele aparecer con mayor frecuencia en aquellos pacientes que han recibido profilaxis prolongadas por ser pacientes de alto riesgo.

También, muy a menudo la presencia de cepas resistentes, se asocia a enfermedad invasiva, disfunción progresiva del injerto, rechazo del órgano trasplantado e incluso mayor mortalidad, que puede afectar hasta el 65% de los pacientes [153,154].

Una de las opciones para el tratamiento de las resistencias es aumentar las dosis de ganciclovir o valganciclovir, siempre que la función renal sea normal.

En el tratamiento de las resistencias a ganciclovir, generalmente el fármaco utilizado como primera opción es el foscarnet solo o en combinación con ganciclovir[155], ya que el cidofovir es mucho más tóxico.

1.5 FARMACOMETRÍA

El término farmacometría apareció en la literatura por primera vez en 1982 en el Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics [156]. Desde entonces se ha reconocido ampliamente la importancia de esta disciplina tanto en la optimización como en el desarrollo de un fármaco, destacando el incremento de literatura que ha existido en este campo. Se define como la ciencia que permite desarrollar y aplicar métodos estadísticos y matemáticos para i) caracterizar, comprender y predecir la farmacocinética y la farmacodinamia ii) cuantificar la incertidumbre asociada a estos procesos, iii) tomar decisiones racionales en farmacoterapia y en el desarrollo de fármacos. Dada su importancia se han publicado guías o recomendaciones para la industria por parte de distintas administraciones (EMA, FDA)[157,158].

La farmacocinética puede definirse como el estudio y caracterización de la evolución temporal de los fármacos y de sus metabolitos en el organismo a través del análisis cinético de las curvas concentración/tiempo o cantidad/tiempo obtenidas a partir de muestras de fluidos biológicos [159].

1.5.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS FARMACOCINÉTICOS

Las aproximaciones más utilizadas en el análisis de datos procedentes de estudios farmacocinéticos son la aproximación no compartimental y la aproximación compartimental, que a su vez puede abordarse desde una perspectiva individual (clásica) o bien poblacional. La diferencia fundamental entre todos estos métodos radica en la sencillez vs complejidad, consumo de tiempo, formación requerida y capacidad descriptiva y predictiva de la información obtenida, entre otros aspectos tal como se muestra en la figura 5.

Aproximaciones para el análisis de datos PK

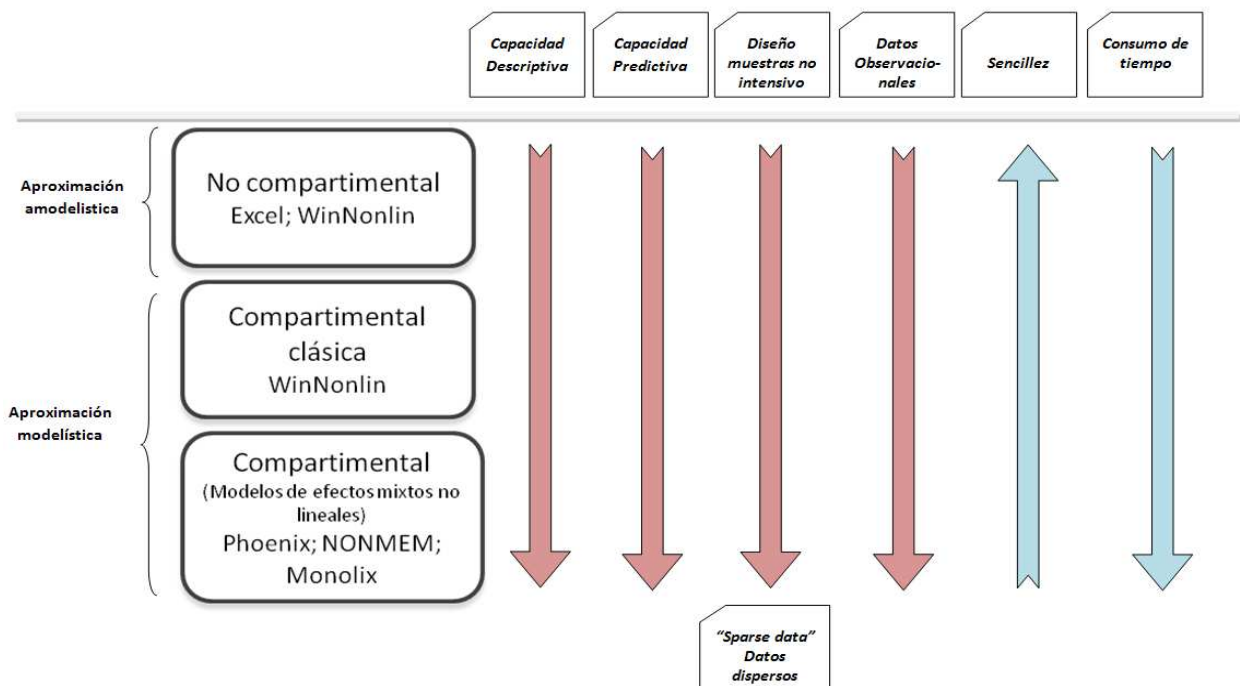


Figura 5: Aproximaciones posibles para el análisis de datos farmacocinéticos.

1.5.1.1. Aproximación no compartimental

Las limitaciones de los métodos compartimentales tales como la complejidad de los métodos matemáticos o la imposibilidad de seleccionar adecuadamente un modelo debido al bajo número de observaciones experimentales, han conllevado al uso del análisis farmacocinético no compartimental.

El análisis de los datos experimentales mediante la aproximación no compartimental permite estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de ajustar un modelo matemático específico a los mismos. Este tipo de análisis proporciona estimas puntuales de los parámetros farmacocinéticos para un individuo, situación y en un punto temporal concreto y en consecuencia es difícil predecir lo que ocurrirá en distintos escenarios no ensayados. Como consecuencia solo puede utilizarse con fines predictivos si se asume que el aclaramiento plasmático del fármaco permanece constante con respecto al tiempo y que la relación entre la velocidad de entrada del fármaco y la concentración plasmática resultante, tiene las propiedades de superposición e invariabilidad en el tiempo.

En el análisis farmacocinético no compartimental la única asunción matemática que se hace es considerar que el curso de las concentraciones asociadas a la fase terminal de la curva de concentración plasmática vs tiempo sigue una cinética de orden uno. Por tanto considera la existencia de una fase monoexponencial terminal en el curso temporal de las concentraciones plasmáticas del fármaco cuya pendiente (λ_z) estimada mediante regresión lineal semilogarítmica proporciona el valor de la constante de velocidad del proceso cinético de orden uno. Una vez conocida dicha pendiente, es posible determinar la semivida aparente de eliminación ($t_{1/2\lambda_z}$). El cálculo de los demás parámetros mediante esta aproximación es sencillo siempre que se disponga de la información experimental requerida tal como describen Domenech y col[160]. La principal limitación de este método se basa en poder disponer de una fase terminal correctamente delimitada hecho que a veces resulta difícil en la práctica clínica debido a la imposibilidad de extraer muchas muestras por paciente.

1.5.1.2 Aproximación compartimental

La aproximación compartimental utiliza modelos matemáticos para describir la evolución de las concentraciones del fármaco a lo largo del tiempo y a partir de éstos, es posible la estimar los parámetros farmacocinéticos que permitirán describir el comportamiento del fármaco en el individuo. Los modelos matemáticos basados en compartimentos son los más utilizados[161]. Un compartimento representa una fracción de material biológico en la que el fármaco está uniformemente distribuido y tiene las mismas propiedades cinéticas. El organismo es un sistema muy complejo y aunque teóricamente puede dividirse en un amplio número de compartimentos, esto requeriría un complejo tratamiento matemático y un elevado número de observaciones. Por este motivo, en la práctica, se utiliza un máximo de tres compartimentos. Es importante destacar, que un compartimento, no siempre abarca una entidad fisiológica sino que se trata de una unidad conceptual, ya que a veces zonas próximas o relacionadas pueden pertenecer a compartimentos distintos. La Figura 7 muestra la representación esquemática de los modelos de uno (a), dos (b) y tres (c) compartimentos tras la administración

intravenosa del fármaco. En el modelo de un compartimento, se considera al organismo como un único compartimento en el que el fármaco se distribuye instantáneamente ocupando un volumen de distribución (V) y se elimina por una constante de eliminación de primer orden (K_{el}). En el modelo de dos compartimentos, se asume que el fármaco se distribuye de forma instantánea en un compartimento central (C) y de aquí a un compartimento periférico (P_1), retornando luego al compartimento central para ser eliminado. El aclaramiento intercompartimental (Q) rige la distribución del fármaco entre ambos compartimentos de acuerdo con un proceso cinético de primer orden. V_1 representa el volumen de distribución del compartimento central y V_2 el del compartimento periférico. El proceso de eliminación ocurre únicamente desde el compartimento central (K_{el}). En el modelo de tres compartimentos, el fármaco se distribuye instantáneamente en un compartimento central (C), y de aquí a un compartimento periférico superficial (P_1) y de forma más lenta a un compartimento periférico profundo (P_2). V_1 , V_2 y V_3 representan los volúmenes de distribución de los compartimentos central, periférico superficial y periférico profundo, respectivamente. Desde los compartimentos periféricos, el fármaco retorna al compartimento central para ser eliminado (K_{el}). Los aclaramientos intercompartimentales rigen la distribución del fármaco entre el compartimento central y el compartimento periférico superficial (Q_1) y entre el compartimento central y el compartimento periférico profundo (Q_2) de acuerdo con un proceso cinético de primer orden.

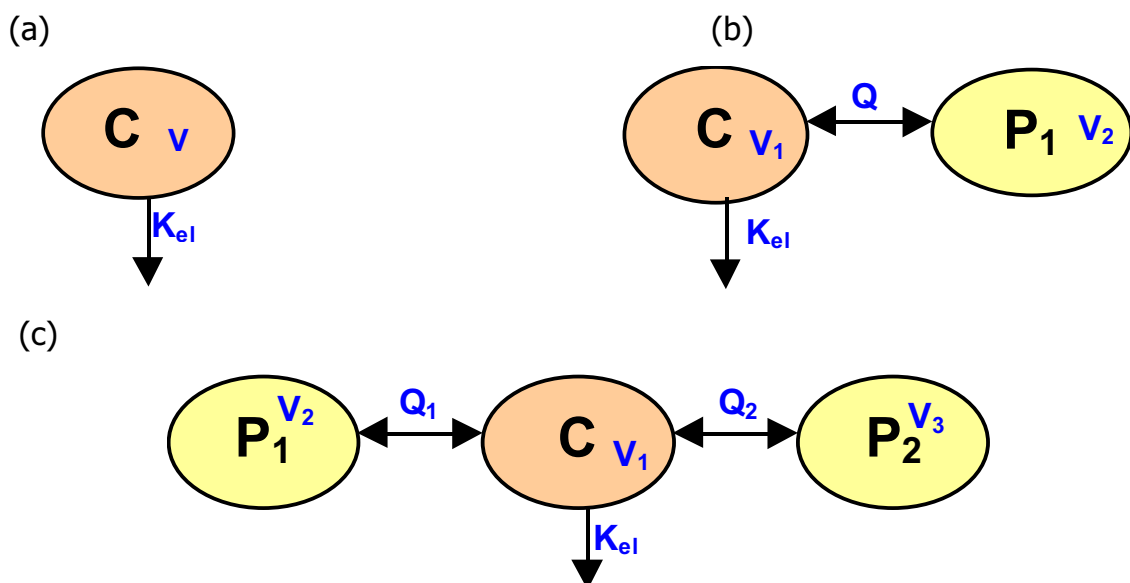


Figura 6: Representación esquemática de los modelos de uno (a), dos (b) y tres (c) compartimentos tras la administración de un fármaco mediante un bolus intravenoso.

Los modelos de la Figura 6 permiten también describir la cinética de un fármaco administrado por vía extravasal añadiendo un compartimento externo que representa el lugar de absorción donde se deposita la dosis de fármaco.

El análisis compartimental puede aplicarse individuo a individuo para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos individuales sin tener en cuenta la variabilidad interindividual asociada, siendo esta la aproximación clásica conocido como ***farmacocinética individual***.

Sin embargo desde hace aproximadamente tres décadas el análisis de datos farmacocinéticos mediante modelos matemáticos se ha dirigido hacia la ***aproximación poblacional*** cuya filosofía se describe a continuación.

FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL

Los escenarios que permiten aplicar la aproximación farmacocinética poblacional son muy amplios tanto en la práctica clínica rutinaria como en las distintas etapas de desarrollo de un fármaco. Aunque surgió de la necesidad de estimar parámetros farmacocinéticos a partir de datos procedentes de la monitorización terapéutica[162,163,164], la farmacocinética poblacional ha experimentado una gran evolución desde su origen hasta la actualidad, adquiriendo un papel muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos.

Además, la farmacocinética poblacional ofrece la posibilidad de efectuar análisis simultáneos integrando toda la información farmacocinética de un fármaco, no solo a partir de datos procedentes de diseños de muestreo relativamente dispersos ("sparse data") sino también a partir de datos procedentes de diseños intensivos ("dense data") o a partir de la combinación de ambos, diseños balanceados con el mismo número de muestras por individuo vs diseños no balanceados, así como de estudios que están normalmente excluidos debido a que su diseño no permite el análisis farmacocinético clásico. A modo de ejemplo, en los estudios preclínicos o en los estudios clínicos de fase II y III, se suele disponer de pocos datos por

individuo, siendo insuficientes para describir el perfil farmacocinético individual completo. El análisis compartimental clásico así como el análisis no compartimental de estos datos obliga a considerarlos como si provinieran todos de un mismo individuo y no permite discernir entre variabilidad interindividual y residual. Como consecuencia de todo ello, en estos casos, la estimación de los valores de los parámetros farmacocinéticos puede ser inexacta.

La farmacocinética poblacional se define como el estudio de las fuentes de variabilidad en las concentraciones de fármaco entre individuos que reciben un régimen de dosificación estándar[158]. Esta aproximación permite analizar simultáneamente la información de todos los sujetos en la población de estudio, y i) estimar el valor medio de los parámetros farmacocinéticos, ii) cuantificar tanto la magnitud de la variabilidad asociada a los parámetros farmacocinéticos dentro de la población de estudio como la contribución de determinadas características individuales (peso corporal, edad, sexo, etc.), fisiopatológicas (parámetros relacionados con la funcionalidad renal o hepática, etc.) o terapéuticas (la presencia de tratamientos concomitantes, etc.) a dicha variabilidad iii) estimar la variabilidad o error asociado a las concentraciones experimentales.

Existen diferentes métodos para la estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales[165] destacando entre ellos i) el método de datos agrupados ("naive pooled" data), ii) el método de las dos etapas y iii) el método de los modelos no lineales de efectos mixtos.

Método de datos agrupados "Naive pooled data"

Es el método más simple de todos y puede ser útil cuando existe poca variabilidad entre los individuos. Se basa en analizar todos los datos provenientes de los diferentes individuos como si provinieran de uno único. Para que los datos sean comparables, deben normalizarse por las dosis. Este método permite conocer la tendencia central de los parámetros farmacocinéticos. Las principales ventajas de este método son la facilidad de su aplicación y que puede usarse con una gran variedad de diseños, como por ejemplo diseños de datos dispersos o bien a partir de diseños con un número distinto de muestras por individuo. Sin embargo este

método no permite el cálculo de los parámetros farmacocinéticos individuales, no distingue entre la variabilidad interindividual y la residual y no permite la inclusión de covariables. Todo ello, puede dar lugar a sesgo en la estima de los parámetros.

Método en dos etapas "Two-stageMethod"

La aproximación en dos etapas es el método tradicional de análisis farmacocinético. En la primera etapa se estiman los parámetros farmacocinéticos de cada individuo por separado mediante métodos de regresión no lineal. En este caso, es posible calcular los valores medios, varianzas y covarianzas de cada parámetro a partir de los valores individuales de los mismos y por tanto conocer la variabilidad interindividual. En una segunda etapa, este método permite de forma sencilla, relacionar mediante técnicas estadísticas multivariantes los valores de los parámetros farmacocinéticos individuales y las covariables de interés. Esta aproximación presenta también algunos inconvenientes como se describe a continuación:

- i. Requiere un mínimo número de datos de concentración plasmática vs tiempo por individuo así como un diseño adecuado en los tiempos de muestreo para que todos los parámetros puedan ser estimados con precisión[166].
- ii. Tiende a sobreestimar la variabilidad interindividual asociada a los parámetros farmacocinéticos.
- iii. El comportamiento farmacocinético de todos los individuos debe ser descrito por el mismo modelo estructural, siendo ello una limitación especialmente cuando los datos a modelizar proceden de administraciones por vías extravasales.

Modelos no lineales de efectos mixtos

Los modelos de efectos mixtos, incluyen los denominados efectos fijos que corresponden a los parámetros farmacocinéticos y coeficientes de regresión de las covariables que describen parte de la variabilidad interindividual debida a características individuales conocidas y los efectos aleatorios que corresponden a

la variabilidad interindividual y residual[167]. Esta aproximación, permite el análisis simultáneo de todos los datos para estimar los valores de los parámetros farmacocinéticos (efectos fijos) y de la varianza asociada a las distribuciones de los efectos aleatorios interindividuales (η) y residuales (ϵ).

Los modelos de efectos mixtos se basan en la asunción de que los parámetros farmacocinéticos individuales de una población siguen una distribución normal. Esta distribución puede ser descrita por la media poblacional del parámetro y la varianza asociada. De esta manera, cada parámetro farmacocinético individual viene dado por la media poblacional o valor típico del parámetro más una desviación con respecto al valor típico, o dicho de otra forma, esta desviación es la diferencia entre la media poblacional del parámetro y el valor del parámetro individual.

De acuerdo con estos modelos, la concentración plasmática observada en un individuo dado i , a un tiempo dado j , puede describirse mediante la ecuación 8.

$$Y_{ij} = f(D_i, F_{ci}, X_i, t_{ij}) + \epsilon_{ij} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo, Y_{ij} : Concentración plasmática del fármaco en el individuo i al tiempo j (t_{ij}), f : Modelo farmacocinético que mejor describe las observaciones experimentales (modelo estructural), F_{ci} : Vector de parámetros del modelo estructural, D_i : Dosis de fármaco administrada, X_i : Características demográficas del individuo y ϵ_{ij} : Error residual o diferencia entre el valor de concentración predicho por el modelo y el observado para el individuo i al tiempo j .

Tal como se observa en la Figura 7 los modelos no lineales de efectos mixtos, son modelos jerárquicos que presentan dos niveles de variabilidad; los efectos aleatorios interindividuales (η_i) que pertenecen al primer nivel y los efectos aleatorios residuales (ϵ_{ij}) que pertenecen al segundo, estando éstos anidados en los primeros.

Modelos de efectos mixtos no lineales

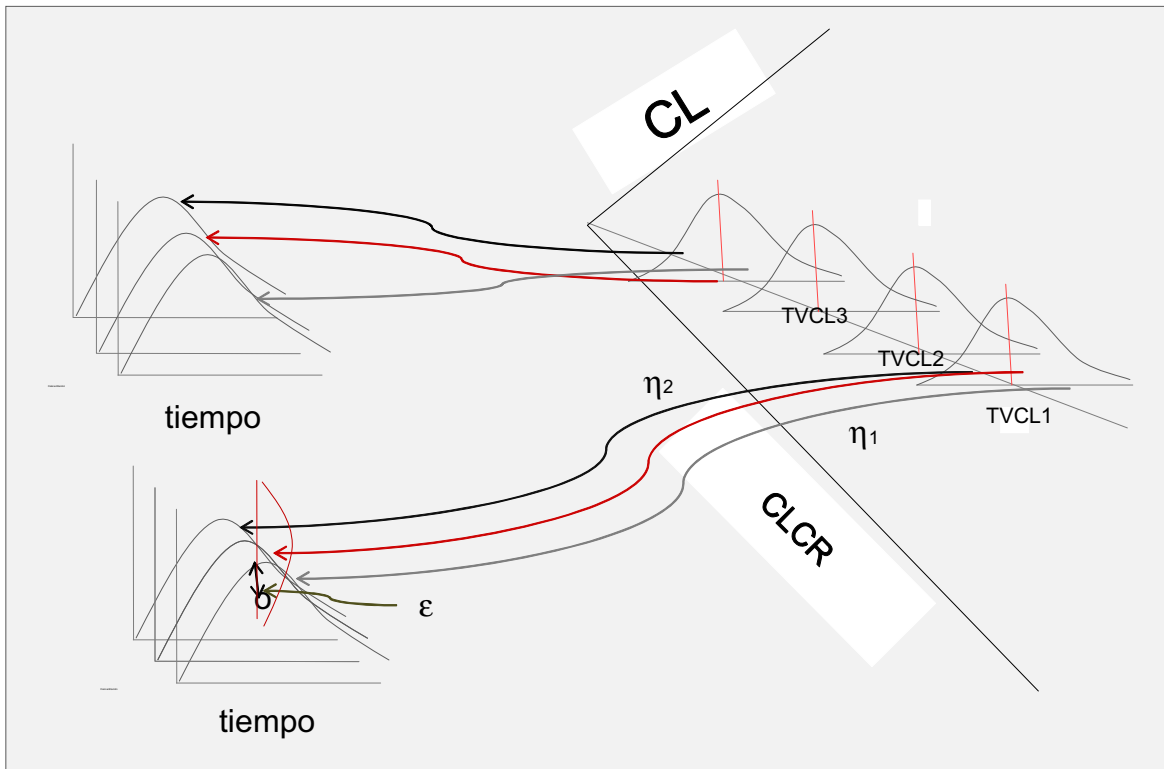


Figura 7. Modelos no lineales de efectos mixtos (modelos jerárquicos): Efectos aleatorios residuales (ϵ) anidados dentro de los efectos aleatorios interindividuales (η).

Tal como ya se ha descrito, la principal ventaja de este método es que permite el análisis de datos dispersos y de datos provenientes de individuos con un número distinto de muestras por individuo, diseños no balanceados, etc...de forma simultánea (análisis en una sola etapa) pero preservando su individualidad. Además, permite la estimación de parámetros poblacionales e individuales. Para ello, se requiere de complejos algoritmos de cálculo y puede requerir de bastante tiempo durante el proceso de modelización.

Los modelos no lineales de efectos mixtos permiten métodos de estimación paramétrica y no paramétrica:

- Aproximación paramétrica. Asume que los parámetros presentan una distribución conocida (normal o log-normal) caracterizada por una media y sus correspondientes medidas de dispersión (varianza). Los métodos de estimación paramétrica más utilizados en farmacocinética poblacional son los siguientes:

– *FO (First-order estimation model)*: Método de estimación de primer orden: Mediante este método, las η no entran dentro del proceso de minimización de la función objetiva y toman el valor 0 (la media poblacional de η es igual a 0) durante el proceso de estimación. Como consecuencia mediante dicho método pueden obtenerse estimas sesgadas de los parámetros poblacionales, por lo que no es el más recomendable.

– *FOCE (First-Order conditional estimation method)*: Método de estimación condicional de primer orden: Mediante este método, las η intervienen durante el proceso de estimación y toman el valor de las estimas condicionales de η . La opción FOCE INTERACTION tiene en cuenta la posible interacción existente entre ε y η . Este método permite obtener estimas no sesgadas de los parámetros poblacionales.

- Aproximación no paramétrica. Esta aproximación surge de la imposibilidad de caracterizar la distribución de los parámetros poblacionales como normales o log-normales. Se basa en maximizar la probabilidad (función de densidad) de que los parámetros estimados describan adecuadamente el proceso que representa[168]. Tanto el método no paramétrico de máxima verosimilitud (NPML)[169] como el método no paramétrico de máxima expectación (NPEM)[170] no permiten cuantificar los intervalos de confianza de las distribuciones obtenidas ni separar las fuentes de variabilidad inter e intraindividual.

En las últimas décadas han surgido varios programas que permiten desarrollar modelos farmacocinéticos poblacionales mediante la aproximación de los modelos de efectos mixtos no lineales. NONMEM es quizás el programa más ampliamente utilizado. Se trata de un programa escrito en lenguaje FORTRAN inicialmente desarrollado en la Universidad de California, San Francisco, por Beal y Sheiner[171] y que actualmente ha evolucionado hasta la versión 7. Es un programa diseñado para ajustar modelos fármaco estadísticos mediante procedimientos de regresión no lineal a los datos experimentales de concentración plasmática frente al tiempo, con el objetivo de estimar el valor típico de los parámetros farmacocinéticos, la incertidumbre asociada a los mismos o variabilidad

interindividual y la variabilidad asociada a las concentraciones o error residual, así como identificar aquellos factores o características individuales que pueden explicar parte de la variabilidad asociada a los parámetros farmacocinéticos.

El desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional mediante NONMEM engloba la modelización de la parte estructural o fija y de la parte aleatoria o estadística. 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 individuos. El modelo estadístico tiene por objetivo modelizar y evaluar la magnitud de la variabilidad interindividual asociada a los parámetros farmacocinéticos y de la variabilidad residual asociada a las concentraciones.

MODELO ESTRUCTURAL

El modelo estructural describe el comportamiento farmacocinético medio (también denominado típico) del fármaco en la población de estudio. En una primera etapa se desarrolla el modelo base que es aquel que mejor describe las observaciones en ausencia de covariables. Aunque se disponga de información previa procedente de estudios previos, la estrategia a seguir suele ser ajustar los modelos de uno, dos y tres compartimentos combinando con distintas cinéticas de absorción (en caso de que el fármaco se haya administrado por vía extravasal) seleccionando el modelo más óptimo en base a criterios estadísticos (test de razón de máxima verosimilitud, LRT; criterio de Akaike, AIC)[172], precisión en los parámetros estimados, y a través de la exploración de gráficos de bondad de ajustado.

Una covariable se define como aquella característica de un individuo que puede afectar al comportamiento del fármaco a través de un cambio en sus parámetros cinéticos. La incorporación de covariables en un modelo poblacional debería disminuir la variabilidad interindividual, identificar subpoblaciones con mayor riesgo de fracaso terapéutico (disminución de la eficacia o aumento de toxicidad al tratamiento), aumentar la capacidad predictiva del modelo, aumentar el carácter mecanicista del modelo y/o permitir explorar el posible impacto de otras covariables en los parámetros del modelo.

La forma en la que el parámetro cambia en función de los valores de las covariables se puede modelar mediante diferentes expresiones matemáticas dependiendo de las características de cada una de las covariables (continua o categórica) y de su influencia en el parámetro.

MODELO ESTADÍSTICO

Los **efectos aleatorios interindividuales**(η) representan la diferencia entre el parámetro farmacocinético individual y el parámetro farmacocinético poblacional. La variabilidad interindividual puede ser modelada como:

- Modelo aditivo: η se añade al valor poblacional. La varianza del parámetro es constante a lo largo de todo el rango de valores del parámetro.

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} + \eta_{1i} \qquad \text{Ecuación 2}$$

Dónde: θ_{1i} : Parámetro farmacocinético en el individuo i , θ_{1pop} : Valor típico del parámetro farmacocinético y η_{1i} : Variable aleatoria para el individuo i en el parámetro farmacocinético.

- Modelo proporcional: η se multiplica al valor típico del parámetro farmacocinético poblacional. La varianza aumenta a medida que aumenta el valor del parámetro.

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} \cdot (1 + \eta_{1i}) \qquad \text{Ecuación 3}$$

- Modelo exponencial: basado en un modelo de error exponencial. Suele ser el modelo de elección para modelar la variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos.

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} \cdot \left(e^{\eta_{1i}} \right) \qquad \text{Ecuación 4}$$

En la ecuación 3 se asume una distribución normal mientras que en la ecuación 4 se asume una distribución logo-normal en la que los parámetros individuales no alcanzarán valores negativos. Esto se ajusta a lo esperable desde un punto de vista fisiológico.

La magnitud de la variabilidad interindividual puede expresarse en términos de coeficiente de variación porcentual (CV%), cuyo cálculo depende del modelo de

variabilidad interindividual seleccionado. Así, en el caso del modelo proporcional y del modelo exponencial, el CV% se calcula a partir de la ecuación 5:

$$CV(\%) = \sqrt{\omega^2} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Para una población con un número m de individuos, los valores de η_{1i} representan la desviación de los parámetros de cada individuo respecto al valor medio poblacional. Esta desviación tiene una distribución aleatoria simétricamente distribuida alrededor de 0 y con una varianza igual a ω_p^2 . El valor de ω_p^2 representa la variabilidad interindividual asociada al parámetro.

Los **efectos aleatorios residuales (ϵ)** cuantifican las desviaciones entre las concentraciones predichas por el modelo y las concentraciones observadas en el individuo que no pueden explicarse mediante el modelo poblacional propuesto. Se asume que los efectos aleatorios residuales son independientes entre sí y presentan una distribución simétrica alrededor de cero y varianza σ^2 , Los efectos aleatorios residuales pueden modelarse como:

- Modelo aditivo: ϵ se añade a la función que describe el perfil farmacocinético del individuo. La varianza asociada a las concentraciones es constante e independiente del valor de éstas.

$$C_{ij} = f(D_i, F_{ci}, X_i, t_{ij}) + \epsilon_{ij} \quad \text{Ecuación 6}$$

- Modelo proporcional: ϵ se multiplica a la función que describe el perfil farmacocinético del individuo. La varianza asociada a las concentraciones aumenta proporcionalmente con la magnitud de éstas.

$$C_{ij} = f(D_i, F_{ci}, X_i, t_{ij}) \cdot (1 + \epsilon_{ij}) \quad \text{Ecuación 7}$$

- Modelo combinado (aditivo-proporcional): Es la combinación entre el modelo aditivo y el proporcional. La variabilidad residual tiene dos componentes aditivo y proporcional. Ambos se añaden a la función que describe el perfil farmacocinético del individuo.

$$C_{ij} = f(D_i, F_{ci}, X_i, t_{ij}) \cdot (1 + \varepsilon_{ij1}) + \varepsilon_{ij2} \quad \text{Ecuación 8}$$

Se asume que el conjunto de los efectos aleatorios residuales están simétricamente distribuidos alrededor de 0 y la varianza de dicha distribución es σ^2 . La matriz varianza-covarianza Σ engloba a las varianzas $\sigma^2_1 \dots n$ (n es el número errores residuales considerados asociados a distintos tipos de datos concentración frente al tiempo, si procede) y la posible covarianza que caracteriza la variabilidad residual.

En aquellos casos en que se trabaja con datos logotransformados, el modelo de error residual se convierte en el modelo de error aditivo para datos logotransformados dado por la ecuación 9.

$$y_{ij} = \ln[f(\theta_i, D_i, x_{ij})] + \varepsilon_j \quad \text{Ecuación 9}$$

Siendo, en este caso y_{ij} , las concentraciones de cada individuo i a un tiempo j expresadas en logaritmos neperianos.

MÉTODOS DE SELECCIÓN Y DISCRIMINACIÓN ENTRE MODELOS

Para la evaluación del modelo poblacional, no existe un único criterio que permita discriminar entre modelos de forma óptima. Los métodos más ampliamente utilizados para la evaluación y discriminación de modelos se basan fundamentalmente en criterios numéricos y gráficos de bondad de ajuste.

1. Criterios numéricos

La función objetiva (OFV) da cuenta de la diferencia entre los valores de concentración observados y predichos para un grupo de individuos. Permite describir la bondad del ajuste de un modelo dado a los datos experimentales y asumiendo que el modelo es correcto, determina la máxima probabilidad de predecir los datos observados (función de máxima verosimilitud). Asimismo, permite discriminar entre los distintos modelos ajustados a los mismos datos para la selección del modelo óptimo. Puesto que de hecho, la función objetiva es igual a -2 veces el valor del logaritmo de la función de máxima verosimilitud (-2·log likelihood, -2LL), cuanto menor sea su valor, mayor probabilidad de que el modelo describa adecuadamente los datos observados.

$$-2\log(L) = n\log(2\pi) + \sum_{i=1}^n \left(\log\sigma_i^2 + \frac{(y_i - \hat{y})^2}{\sigma_i^2} \right) \quad \text{Ecuación 10}$$

Para modelos anidados que solo difieran en un parámetro, la diferencia entre los valores de sus respectivas funciones objetivas sigue una distribución de xi-cuadrado con un grado de libertad. Como consecuencia la significancia del parámetro que diferencie a ambos modelos será del 5% ($p < 0.05$) si del modelo reducido al completo existe una disminución de la función objetiva de 3.84 puntos, y del 0.5% ($p < 0.005$) si la reducción es de 7.8 puntos[173]: Para modelos no anidados se utiliza como criterio discriminativo el criterio de información Akaike (AkaikeInformationCriteria-AIC)[172]:

$$AIC = MVOF + 2 \cdot P \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde MVOF corresponde al valor mínimo de la función objetiva y P es el número total de parámetros del modelo. El modelo que proporcione el mínimo valor de AIC será el que mejor describe los datos experimentales.

2. Precisión en los valores de los parámetros estimados

El error estándar relativo de los valores de los parámetros estimados (EER%) permite conocer el grado de precisión/imprecisión en su estimación. Cuanto menor es el valor de EER% mayor es la precisión con la que se estima el parámetro. El valor del EER% viene dado por la ecuación 12:

$$EER\% = (\text{error estándar} / \text{valor medio del parámetro}) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

3. Gráficos de bondad de ajuste

Los gráficos de la bondad de ajuste permiten detectar desviaciones o tendencias debidas ya sea al modelo estructural o bien estadístico, desarrollados. Los datos observados (DV), las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) frente al tiempo tras la última dosis administrada son los gráficos más utilizados en la literatura[174,175]. Estos gráficos permiten tener una impresión general del ajustado del modelo. En la figura 8 se representan los valores observados(DV)

frente a los predichos poblacionales (PRED) así como los valores observados frente a los predichos individuales (IPRED). La línea sólida representa la línea de identidad y la línea roja representa la línea de tendencia general de los datos.

Si el modelo estructural es adecuado, los datos estarán agrupados uniformemente alrededor de la línea de identidad a lo largo de todo el ámbito de concentraciones. El gráfico IPRED frente al tiempo tiene un mejor ajustado ya que incorpora la variabilidad interindividual necesaria para el ajuste individual de los datos.

Dicha figura 8 incluye también los gráficos de los residuales ponderados poblacionales condicionales vs tiempo (CWRES=PRED-DV/W) y los residuales individuales ponderados (IWRES=IPRED-DV/W) vs las predicciones individuales. En ambos casos debería existir una distribución homogénea alrededor de cero, sin ninguna tendencia. Asimismo la magnitud de los IWRES debería ser inferior a la magnitud de los WRES.

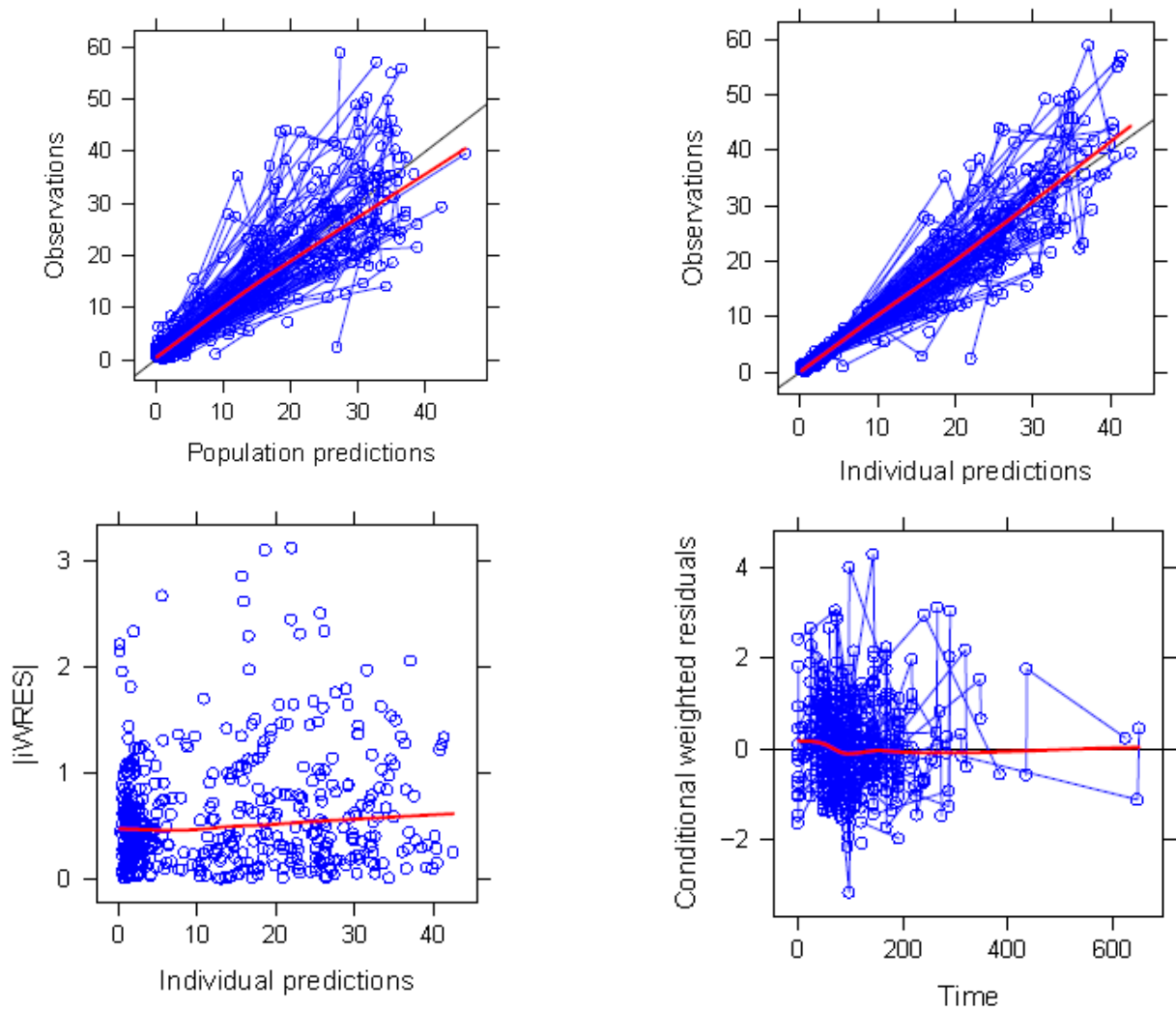


Figura 8: Gráficos de bondad de ajuste: Concentraciones experimentales vs concentraciones poblacionales predichas (panel superior izquierdo), Concentraciones experimentales vs concentraciones individuales predichas (panel superior derecho), residuales individuales ponderados (IWRES) vs concentraciones individuales predichas (panel inferior izquierdo) y residuales condicionales poblacionales vs tiempo (panel inferior derecho).

MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE MODELOS.

La evaluación del modelo permite conocer su capacidad predictiva. Para ello existen métodos de evaluación o validación interna y métodos de validación externa. Los métodos de validación interna utilizan fundamentalmente la herramienta de la simulación, mientras que los métodos de validación externa se basan en la predicción bayesiana. Estas técnicas suelen aplicarse una vez desarrollado el modelo final pero pueden ser también muy útiles durante el desarrollo del modelo como herramienta de ayuda en la discriminación de modelos.

Por otra parte es conveniente conocer el valor del "shrinkage" tanto del modelo base como del modelo final desarrollado.

Métodos de validación interna

Técnica de Bootstrap:

El "bootstrapping"[176] es un método de re-muestreo en que se muestrea la población original N veces. El tamaño de la muestra suele ser igual al de la población original de forma que en cada muestra pueden existir individuos repetidos. El bootstrap puede ser de tipo paramétrico o no paramétrico. En el bootstrap paramétrico se generan pseudo-muestras distribuidas de acuerdo con la distribución del modelo desarrollado (distribución normal) mientras que en el no paramétrico se realiza a partir del archivo de datos originales. El modelo se ajusta a los datos de cada pseudo-muestra y se estiman los mismos parámetros que en la población original para cada una de las muestras. A partir de dichos valores se calcula la media de los valores muestrales y los intervalos de confianza asociados a dicha media.

Evaluación visual predictiva (vpc) y Evaluación visual predictiva corregida por la predicción (pcVPC):

La evaluación predictiva consiste en múltiples simulaciones a partir del modelo y distribuciones de referencia de las mismas características que los datos experimentales. La evaluación visual predictiva (vpc) consiste en un gráfico diagnóstico en el que se superponen las concentraciones experimentales frente al tiempo junto con el decurso de los intervalos de predicción de los datos simulados frente al tiempo. Esta aproximación permite el diagnóstico tanto de los efectos fijos como de los efectos aleatorios del modelo.

Otro tipo de gráfico diagnóstico basado en técnicas de simulación es la evaluación visual predictiva corregida por la predicción (pc-VPC) en la que tanto las observaciones como y las predicciones del modelo se normalizan por las predicciones típicas del modelo (a su vez dependientes de las dosis administradas y de los valores de las covariables que hayan resultado ser significativas en el modelo), en distintos intervalos considerados para la variable independiente[177]. Esta normalización evita tener que estratificar con tantos gráficos vpc como distintos valores de las covariables que hayan resultado ser significativas en el modelo, hecho que llevaría a gráficos poco informativos.

Evaluación predictiva posterior (PPC)[178]: Esta técnica se basa en comparar las distribuciones de los valores de un parámetro de interés que pueda estar relacionado con la eficacia al fármaco (AUC o área bajo la curva de concentraciones plasmáticas vs tiempo, C_{max} o concentración plasmática máxima etc...) estimados a partir de los datos experimentales con respecto a los estimados a partir de datos simulados de concentración vs tiempo de 1000 poblaciones idénticas a la original, a partir del modelo.

Errores de las distribuciones de predicción normalizados (NPDE)[179]: En esta técnica relativamente nueva, se simulan también 1000 poblaciones como la original a partir del modelo desarrollado, se calculan los errores o discrepancias para los datos observados y simulados y se comparan ambas distribuciones con respecto a una distribución normal.

Métodos de validación externa:

La validación externa es la técnica que proporciona mayor evidencia de la capacidad predictiva del modelo. Esta técnica consiste en predecir a partir del modelo las concentraciones individuales en un grupo de pacientes de características similares a los de la población de desarrollo del modelo pero que no se han utilizado para ello. Las concentraciones individuales predichas se comparan con las observadas en términos de exactitud y precisión de acuerdo con el método propuesto por Sheiner y Beal[180].

Shrinkage:

El valor de " ϵ -shrinkage" se utiliza para cuantificar cómo de informativo es el gráfico. Tiene un valor que va de cero a uno. Cuanto más se acerca a uno, menos informativo resulta el gráfico. La ecuación 13 muestra el cálculo de " ϵ -shrinkage", donde SD (IWRES) es la desviación estándar de los residuales individuales ponderados (IWRES). Un valor de "shrinkage" superior al 20% supone una pérdida de significancia del gráfico IPRED vs DV [181].

$$\epsilon - \text{shrinkage} = 1 - \text{SD}(\text{IWRES}) \quad \text{Ecuación 13}$$

El concepto de "shrinkage" también se aplica a la variabilidad interindividual durante la selección de covariables.

Un valor alto de " η -shrinkage" se asocia con una estimación menos fiable de la variabilidad interindividual. La ecuación 14 muestra el cálculo de " η -shrinkage" donde $\text{SD}(\eta)$ es la desviación estándar de las estimas empíricas bayesianas de la variabilidad interindividual (η) y ω es la estima poblacional del parámetro de η . Cuando los datos son muy informativos, el " η -shrinkage" es cero y tiende a 1 cuando son menos informativos. Cuando el " η -shrinkage" es alto los parámetros individuales tienden a la estima poblacional y en este caso los gráficos diagnóstico de los parámetros individuales vs covariables pueden ser interpretados incorrectamente.

$$\eta_x - \text{shrinkage} = 1 - \left(\frac{SD(\eta_x)}{\omega} \right) \quad \text{Ecuación 14}$$

1.5.1.3 Aproximación Bayesiana

En farmacocinética clínica es bastante común disponer de un número reducido de datos de concentración por paciente, por lo que difícilmente pueden estimarse parámetros farmacocinéticos con precisión mediante los métodos de regresión no lineal clásicos. Los parámetros farmacocinéticos deberían estimarse con la máxima precisión posible puesto que luego se utilizarán para el ajuste de dosis durante la monitorización terapéutica. De acuerdo con esta problemática, Bayes [182] propuso una teoría que permitía el cálculo de la probabilidad de que ocurra un evento en base a la probabilidad inicial o "a priori" y la contribución de nuevos datos.

El método Bayesiano permite incorporar en el modelo no solo información experimental (datos de concentración vs tiempo) de un nuevo individuo sino también información conocida "a priori" del comportamiento farmacocinético del fármaco en una población conocida de las mismas características que las del individuo. El teorema de Bayes describe la relación cuantitativa entre la probabilidad a priori de que un individuo presente unos parámetros farmacocinéticos dados antes de conocer sus concentraciones plasmáticas y la probabilidad a posteriori de obtener parámetros similares una vez conocidas las concentraciones experimentales.

De acuerdo con esta teoría al inicio del tratamiento se dispone de escasa información experimental del paciente por lo que las predicciones de los parámetros farmacocinéticos se basan mucho en la información poblacional, mientras que en cuanto la información individual aumenta las predicciones se aproximan más a los valores individuales obtenidos mediante el análisis por regresión no lineal clásico.

El método Bayesiano permite por tanto predecir los valores individuales de los parámetros farmacocinéticos a partir de escasa información experimental de cada individuo ($n \geq 1$) e información poblacional "a priori" del comportamiento

farmacocinético del fármaco. Cuanto mejor caracterizado esté el comportamiento farmacocinético poblacional del fármaco mejores serán las predicciones de los parámetros farmacocinéticos individuales a utilizar para el ajuste de dosis durante la monitorización terapéutica.

2. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El valganciclovir, ha demostrado su eficacia para el tratamiento de la retinitis en pacientes con SIDA y para la prevención de la infección por citomegalovirus humano en el trasplante de órgano sólido.

Además en los estudios farmacocinéticos realizados en pacientes trasplantados hepáticos se ha demostrado que una dosis de valganciclovir 900 mg permite obtener niveles plasmáticos de ganciclovir similares a los obtenidos con una dosis de ganciclovir 5mg/Kg IV.

Por estos motivos, planteamos la realización de un ensayo clínico piloto para demostrar la eficacia del tratamiento de la enfermedad por citomegalovirus en trasplante de órgano sólido con valganciclovir oral después de una corta inducción con ganciclovir IV, demostrada mediante la desaparición de la viremia y la exposición sistémica a ganciclovir obtenidas tras la administración tanto de ganciclovir IV como de valganciclovir oral.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Los objetivos del presente proyecto de tesis son:

1. Estudiar la eficacia y seguridad y evaluar la farmacodinamia de una estrategia de tratamiento de la infección /enfermedad por citomegalovirus humano corta (21 días) en receptores de un trasplante de órgano sólido basada en ganciclovir IV seguido de valganciclovir oral.
2. Comparar la exposición a ganciclovir después de administrar valganciclovir oral con respecto al ganciclovir IV.
3. Establecer un modelo farmacocinético poblacional del ganciclovir después de la administración de ganciclovir IV seguido de valganciclovir oral mediante el programa NONMEM y evaluar los efectos de diversos factores fisiopatológicos sobre los parámetros cinéticos de disposición, para encontrar potenciales factores predictivos para la individualización de la dosificación.
4. Evaluar la idoneidad de las dosis recomendadas por el fabricante para evitar la infra o supra-exposiciones al fármaco de los pacientes.

4. RESULTADOS

Capítulo1:

Caldés A, Gil-Vernet S, Armendariz Y, Colom H, Pou L, Niubó J, Lladó L, TorrasJ, Manito N, Rufí G, Grinyó JM. Sequential treatment of cytomegalovirus infection or disease with a short course of intravenous ganciclovir followed by oralvalganciclovir: efficacy, safety, and pharmacokinetics. Transpl Infect Dis. 2010 Jun;12(3):204-12.

doi: 10.1111/j.1399-3062.2009.00481.x. Epub 2009 Dec 9. PubMed PMID: 20002612.

Sequential treatment of cytomegalovirus infection or disease with a short course of intravenous ganciclovir followed by oral valganciclovir: efficacy, safety, and pharmacokinetics

A. Caldés, S. Gil-Vernet, Y. Armendariz, H. Colom, L. Pou, J. Niubó, L. Lladó, J. Torras, N. Manito, G. Rufí, J.M. Grinyó. Sequential treatment of cytomegalovirus infection or disease with a short course of intravenous ganciclovir followed by oral valganciclovir: efficacy, safety, and pharmacokinetics
Transpl Infect Dis 2010; 12: 204–212. All rights reserved

Abstract: Oral (p.o.) or intravenous (IV) ganciclovir (GCV) has been the first-line agent for prevention and treatment of cytomegalovirus (CMV) infection and disease in solid organ transplantation (SOT). The introduction of p.o. valganciclovir, with higher bioavailability than p.o. GCV, has proven to be a suitable approach toward outpatient p.o. therapy for CMV infection/disease. The present single-arm, exploratory pilot trial performed with 21 patients investigates the efficacy and safety of a short therapeutic course (21 days) based on an initial IV treatment with GCV (5 mg/kg twice daily, for 5 days) followed by p.o. valganciclovir (900 mg twice daily, for 16 days) for CMV infection/disease in SOT patients. In all cases, doses were adjusted for renal function. Moreover, the study allowed comparison of exposure to GCV after p.o. valganciclovir with respect to IV GCV in the same patients. Response to treatment was monitored until day 180. Viral load eradication was achieved in 66.7% of patients, on day 21. Although not statistically significant, a trend was seen toward increased persistence of viral load on day 21 for patients with donor positive/recipient negative CMV serostatus or receiving either anti-rejection therapy or polyclonal anti-thymocyte globulin. CMV clinical infection recurred in 14.3% of patients, with higher recurrence rates in patients with risk factors for persistence of viremia. Exposures to GCV after using IV GCV or p.o. valganciclovir showed comparable values ($P = 0.054$). This short course, combining initial IV GCV and subsequent p.o. valganciclovir, may provide effective exposure and therapeutic response in the treatment of CMV infection in SOT patients with adequate drug exposure and with the additional potential benefit of shortening the length of hospital stay, which may result in cost reduction and improved patient comfort.

A. Caldés¹, S. Gil-Vernet¹, Y. Armendariz¹, H. Colom², L. Pou³, J. Niubó⁴, L. Lladó⁵, J. Torras⁵, N. Manito⁶, G. Rufí^{7,*}, J.M. Grinyó¹

¹Nephrology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ²Department of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, School of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ³Biochemistry Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, ⁴Microbiology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ⁵Hepatology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ⁶Cardiology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ⁷Infectious Diseases Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

*Deceased.

Key words: cytomegalovirus disease; cytomegalovirus infection; ganciclovir; valganciclovir; efficacy; safety; pharmacokinetics; solid organ transplantation

Correspondence to:
Anna Caldés Escuder, Nephrology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, C/Feixa Llarga s/n, 08028-L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
Tel: + 34 93 260 7385
Fax: + 34 93 260 7607
E-mail: acaldes@bellvitgehospital.cat

Received 23 April 2009, revised 11 September 2009, accepted for publication 22 September 2009

DOI: 10.1111/j.1399-3062.2009.00481.x
Transpl Infect Dis 2010; 12: 204–212

Cytomegalovirus (CMV) is a common viral pathogen after solid organ transplantation (SOT) (1). Early treatment is required to avoid direct and indirect effects (2) that can affect long-term recipient and graft survival (3).

Ganciclovir (GCV), a deoxyguanosine analogue, has been the initial agent of choice for both prevention and treatment of CMV disease in transplant patients (4).

Although intravenous (IV) GCV has been the 'gold standard' for treatment of CMV infection and disease (5), it may be inconvenient for patients as it requires frequent hospitalization and long-term IV catheter access (6), with associated high costs. On the other hand, oral (p.o.) GCV has poor bioavailability and is therefore only useful in the prophylactic setting (7). P.o. valganciclovir, the L-valyl ester

pro-drug of GCV, shows a higher bioavailability than p.o. GCV (around 60%) (8). Valganciclovir is currently authorized for the prevention of CMV disease in kidney, heart, and kidney–pancreas transplant recipients at high risk (donor CMV seropositive/recipient CMV seronegative [D + /R –]) (9), and a recent study has shown efficacy for the treatment of CMV disease in SOT when given for 49 days (10).

Some controversy exists about the ideal duration of treatment for CMV infection/disease, varying between 2 weeks and 3 months (11–13). Prolonged courses of GCV may be expensive and are associated with side effects, although according to some authors (14, 15), this treatment could decrease the risk of CMV recurrences.

Wiltshire et al. (16) have shown that exposure to GCV is related to suppression of CMV viremia and disease, so it is important to achieve the required exposure while avoiding adverse events and development of viral resistance. As previously reported (17), 900 mg of valganciclovir given once daily produced drug exposure to GCV comparable to that obtained with 5 mg/kg of IV GCV in liver recipients. This led us to think that the combined therapy of IV GCV and p.o. valganciclovir might be a good strategy to avoid long-term IV catheter access, while improving patient comfort and reducing costs of CMV therapy in transplant programs.

The aims of the present investigation were (i) to study the efficacy and safety of a short therapeutic course of 21 days combining IV GCV and p.o. valganciclovir, for the treatment of CMV infection/disease in SOT recipients, and (ii) to compare GCV exposure of p.o. valganciclovir with respect to IV GCV.

Material and methods

Study design

This study was a single-center, single-arm, prospective clinical trial to assess efficacy, safety, and exposure to GCV in this brief treatment of CMV infection/disease in SOT patients (ClinicalTrials.gov number: NCT00730769). As an investigator-proposal originated study, it was conducted according to good clinical practice, the Declaration of Helsinki, and applicable local regulatory requirements. All patients gave written informed consent to participate in the study.

SOT recipients (kidney, liver, or heart) were eligible for inclusion if they were ≥ 18 years of age and presented with CMV infection or disease demonstrated by positive CMV antigenemia (pp65) (18). Patients were excluded if their CMV disease was considered life threatening by the investigator, were unable to receive p.o. medication, had absolute neutrophil counts $< 500/\text{mm}^3$, platelets $< 25,000/$

mm^3 , hemoglobin $< 8 \text{ g/dL}$, or estimated glomerular filtration rate $< 10 \text{ mL/min}$ (according to the Cockcroft–Gault formula [19]).

Preemptive therapy was the strategy used for minimizing CMV disease in high-risk patients, including patients with CMV serostatus D + /R – and those receiving induction therapy with anti-thymocyte globulins (ATGs) or anti-rejection therapy in all organ transplant programs (5, 9). Therefore, patients were monitored and treatment started at the time CMV was detected in blood by the antigenemia (pp65) assay. Our threshold for starting therapy was CMV antigenemia (pp65) ≥ 20 positive cells/105 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (18).

Patients received IV GCV (Cymevene[®]; F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) at 5 mg/kg twice daily for 5 days (1 h infusion), followed by p.o. valganciclovir (Valcyte[®]; F. Hoffmann-La Roche Ltd) at 900 mg twice daily (after meals) for 16 days. Doses were adjusted by individual renal function according to the manufacturer's recommendations (Table 1). After the end of the treatment, patients were followed for 6 months.

Definitions of CMV infection/disease and recurrences

According to the current American Society of Transplantation recommendations for the use in clinical trials (20), CMV infection was defined as documented viremia in the absence of signs and symptoms. CMV disease was defined by evidence of CMV infection with attributable symptoms, and sub-classified as viral syndrome or tissue-invasive disease. Viral syndrome included at least one of the following: body temperature $\geq 38^\circ\text{C}$, leukopenia (leukocytes count $\leq 3000/\mu\text{L}$), atypical lymphocytosis $\geq 5\%$, thrombocytopenia (platelet count $\leq 75,000/\mu\text{L}$), new or increased malaise or elevation of hepatic transaminases (alanine aminotransferase or aspartate aminotransferase to $2 \times$ the upper limit of normal). Tissue-invasive disease was defined based on evidence of localized organ CMV in-

Dosing adjustments according to the manufacturer's recommendations, based on estimated glomerular filtration rate (GFR)

Intravenous ganciclovir		Oral valganciclovir	
GFR (mL/min) ¹	Dose (mg/kg)/interval	GFR (mL/min) ¹	Dose (mg)/interval
> 50	5/12 h	> 60	900/12 h
25–50	2.5/12 h	40–59	450/12 h
< 25	2.5/24 h	25–39	450/24 h
		10–24	450/48 h

¹GFR calculated using the Cockcroft–Gault formula (19).

Table 1

fection (CMV inclusion cells or *in situ* detection of CMV antigen or DNA).

Asymptomatic virological recurrences after the end of the treatment were defined in patients with viral eradication on day 21 presenting some degree of viral replication (CMV viral load ≥ 600 copies/mL) that resolved spontaneously during follow-up. Clinical CMV recurrence was considered as occurrence of symptoms and positive antigenemia (pp65) ≥ 20 positive cells/ 10^5 PBMC that required therapeutic intervention.

Virological assessments

Blood samples were obtained at baseline time and, as per protocol, subsequent samples were obtained on days 5, 15, and 21 of treatment and on days 30, 60, 90, and 180 of the follow-up period. CMV antigenemia (pp65) was determined in PBMC, obtained by dextran sedimentation, formaldehyde fixed, stained, and read under a fluorescence microscope (rapid antigenemia anti-human CMV ppUL83, Argene, Varilhes, France) (21). The maximum sensitivity of the method in our laboratory was 1 positive cell/ 2×10^5 PBMC. CMV viral load was measured, *a posteriori*, in plasma samples using the Cobas Amplicor CMV Monitor[®] Test (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA). This was a commercial polymerase chain reaction (PCR) test for the quantification of CMV DNA in plasma. The viral cut-off for defining CMV eradication was set at 600 copies/mL, which is the validated and reproducible quantitative cut-off point of this PCR assay (as per kit instructions).

The presence of mutations conferring GCV resistance was tested by DNA sequencing of the UL97 and the UL54 genes (22) and mutations interpreted according to Erice et al. (23) and Cihlar et al. (24) in the latest positive sample at each infection episode.

Safety assessments

Hematological and biochemistry laboratory parameters were determined at baseline and on days 5, 15, and 21 of treatment and on days 30, 60, 90, and 180 of the follow-up period.

Toxicities were reported according to National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0 guidelines (25). Laboratory parameters with toxicities grade 2 (moderate) or higher were reported as adverse events.

Pharmacokinetic assessments

Serial blood samples (under steady-state conditions) were drawn, before and at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 h after

the start of IV GCV infusion on day 5 and after p.o. valganciclovir administration on day 15 of treatment. GCV serum levels were determined using a validated high-pressure liquid chromatography method with ultraviolet detection (26) with a lower limit of quantification of 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

Data analysis

Clinical efficacy and viral eradication

Efficacy was assessed on the basis of both eradication of viremia measured by PCR and resolution of symptoms on day 21 of therapy. CMV viral load decline versus time curves from day 0 to day 180 were evaluated. The following parameters were estimated for each patient: the baseline viral load (E_0), the maximum viral load suppression achieved (E_{max}), and the time at which it was reached ($T_{E_{\text{max}}}$). Two groups were considered for mean comparison purposes: patients with a baseline viral load $E_0 < 100,000$ copies/mL (low baseline) and patients with $E_0 \geq 100,000$ copies/mL (high baseline), according to Cope et al. (27).

Pharmacokinetics

Exposures to GCV were estimated from serum concentration versus time profiles obtained on day 5 (IV GCV) and day 15 (p.o. valganciclovir) from each patient, by a non-compartmental approach using WinNonlin version 3.3 (28). The area under the serum concentration–time curve (AUC) between dosing intervals was computed using the linear-log trapezoidal rule both after IV GCV and p.o. valganciclovir; bioavailability (F) of p.o. valganciclovir was estimated from the ratio of the dose normalized AUC of valganciclovir (expressed as GCV equivalents) and dose normalized AUC of IV GCV.

It should be noted that AUC values over 0–12, 0–24, or 0–48 h, depending on the dose interval according to renal function adjustment (Table 1), were estimated; for that purpose extrapolations from 12 to 24 or 48 h were performed in those cases in which no experimental concentration was available at 24 or 48 h post dosing.

Moreover, the accumulation rates (R) for each dosing regimen were estimated according to the equation below (29). The pharmacokinetic parameters required for that calculation were taken from a previous population pharmacokinetic analysis of the data of this study recently reported (30). Accumulation rates inferior to 2 were indicative of no accumulation.

$$R = \frac{1}{1 - e^{-\beta\tau}}$$

where β denotes the slow disposition rate constant and τ is the dosing interval.

Statistics

Comparisons of median viral loads and efficacy parameters between 2 groups of patients were analyzed using a non-parametric test (Mann–Whitney *U*-test). A χ^2 -test or Fisher's exact test was used for categorical variables. Comparison of exposure parameter values (AUC) after IV GCV and p.o. valganciclovir was performed using a two-way analysis of variance on the log-transformed variables, with treatment and patient as fixed and random factors, respectively. All the statistical tests were performed by means of the SPSS statistical package v 15.0 (28), with a significance level of 0.05.

Results

Study population

Twenty-one SOT recipients presenting either CMV infection or disease were prospectively included at Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain. The baseline demographic and clinical characteristics, and the corresponding immunosuppressive therapy given to all patients are summarized in Table 2 (19, 31). Immunosuppression differed according to the specific transplant program. Immunosuppressive therapy in heart and liver transplant program mainly consisted of anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibodies, mycophenolate mofetil (MMF), calcineurin inhibitor (CNI), and prednisone. Renal transplant patients received either polyclonal ATG or anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibodies for induction in combination with CNI or mammalian target of rapamycin inhibitor (m-TOR), MMF, and low prednisone doses. Acute rejection episodes were treated with steroid boluses as first-line therapy in all organ transplants programs. In the renal transplant population, polyclonal ATG or monoclonal antibodies were used as induction therapy in 4 patients and to treat corticoreistant acute rejection episodes in 3 patients.

Regarding risk factors for CMV infection/disease, 13 of 21 patients (61.9%) were considered at high risk. Explicitly, 6 of 21 patients (28.6%) showed CMV serostatus D + /R – and 7 of 21 patients (33.3%) received either induction therapy with ATGs or anti-rejection treatment. The rest of the patients, 8 of 21 patients (38.1%), were considered as low-risk patients.

As shown in Table 3, median baseline viral load (E_0) of the study population (21 patients) was 48,850 DNA copies/mL (ranging from 3940 to 517,000 DNA copies/mL). Patients were matched in 2 groups according to their viral load at baseline; statistically significant differences ($P < 0.001$) were found in E_0 values when the groups of patients with high and low baseline viral loads were compared. It is

Summary of the baseline demographic and clinical characteristics of the studied population

Patient characteristics	All
Number of patients	21
Male/female	11/10
Age (years)	54 (11.6)
Weight (kg)	67.4 (13.7)
Height (cm)	161.7 (9.4)
Body surface area (m ²) ¹	1.7 (0.2)
Serum creatinine (mmol/L)	146.5 (100.6)
Glomerular filtration rate (mL/min) ²	58 (25.8)
Type transplant (kidney/liver/heart)	10/6/5
Time after transplantation (days)	49 (12)
<i>CMV serostatus</i>	
D + /R – (n)	6
D + /R + (n)	14
D – /R + (n)	1
<i>Clinical presentation</i>	
Infection (n)	12
Disease (viral syndrome) (n)	6
Disease (tissue invasive) (n)	3
<i>Maintenance immunosuppression</i>	
MMF (yes/no)	16/5
CsA (yes/no)	16/5
TAC (yes/no)	4/17
SRL (yes/no)	3/18
PDN (yes/no)	17/4
<i>Other immunosuppression</i>	
Anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody (yes/no)	13/8
Antithymocyte globulins (yes/no)	7/14
Plasmapheresis (yes/no)	1/20
Rituximab (yes/no)	1/20
Immunoglobulins (yes/no)	1/20
<i>Mean duration of treatment</i>	
Intravenous GCV (days)	5 (1)
Oral VGC (days)	16 (2)

¹Estimated according to DuBois & DuBois (31).
²Estimated according to Cockcroft–Gault (19).
 Mean (standard deviation) values unless stated.
 D + , CMV seropositive donor; D – , CMV seronegative donor; R + , CMV seropositive recipient; R – , CMV seronegative recipient;
 MMF, mycophenolate mofetil; CsA, cyclosporine; TAC, tacrolimus;
 SRL, sirolimus; PDN, prednisone; GCV, ganciclovir; VGC, valganciclovir.

Table 2

Comparative median (min/max) pharmacodynamic parameter values sorted by baseline viral load in solid organ transplant patients with cytomegalovirus infection/disease

Parameter	Baseline viral load		
	Copies/mL (n = 21 patients)	<100,000 DNA copies/mL (n = 12 patients)	≥ 100,000 DNA copies/mL (n = 9 patients)
E_o^* (copies/mL)	48,850 (3940/517,000)	26,750 (3940/57,200)	223,000 (105,000/517,000)
E_{max}^* (copies/mL)	- 48,250 (- 516,400/ - 3340)	- 26,150 (- 56,600/ - 3340)	- 222,400 (- 516,400/ - 104,400)
$T_{E_{max}}$ (days)	15 (5–180)	15 (5–90)	15 (10–180)

*Statistical significant differences were found between patients of baseline viral load <100,000 copies/mL with respect to patients with baseline viral load >100,000 copies/mL, $P < 0.001$.
 E_o , baseline viral load; E_{max} , maximum viral load suppression achieved; $T_{E_{max}}$, time at which E_{max} is reached.

Table 3

noticeable that patients of the low baseline group presented CMV infection while patients of the high baseline group presented CMV disease.

Clinical efficacy and viral eradication

Figure 1 shows the median viral load decay from baseline during the 180 days of the study in all patients, and in patients matched according to their viral load at baseline (<100,000 or ≥ 10,000 copies/mL). All patients responded to treatment as indicated by clinical symptoms resolution and eradication or decay of CMV viral load by the end of treatment (day 21). In more detail, 14 of 21 patients (66.7%) presented viral eradication on day 21, whereas 7 of 21 patients (33.3%) persisted with positive CMV viremia. Table 4 summarizes percentages of viral load eradication or persistence at the end of treatment for each risk-level group of patients considered. As shown, the percentages

of viral eradication on day 21 for the low-risk patients were higher than for patients with D + /R – serostatus or receiving anti-rejection/polyclonal ATG therapy, although no statistically significant differences were found ($P = 0.299$). On the other hand, statistically significant differences ($P = 0.025$) were observed in median baseline viral loads of patients with viral eradication on day 21 (median: 33,250 DNA copies/mL, range: 3940–227,000 copies/mL) with respect to those that showed viral persistence (median: 200,000 DNA copies/mL, range: 31,800–517,000 copies/mL).

The maximum viral load suppression (E_{max}) was reached at 15 days ($T_{E_{max}}$) (range 5–180 days) overall, at 15 days (range 5–90 days) in the low baseline group and at 15 days (range 10–180 days) in the high baseline group (Table 3). Therefore, a tendency towards shorter $T_{E_{max}}$ values was observed in the low baseline group with respect to the highest. This suggested that the rate of viral load eradication was baseline dependent. Statistically significant differences ($P < 0.001$) were

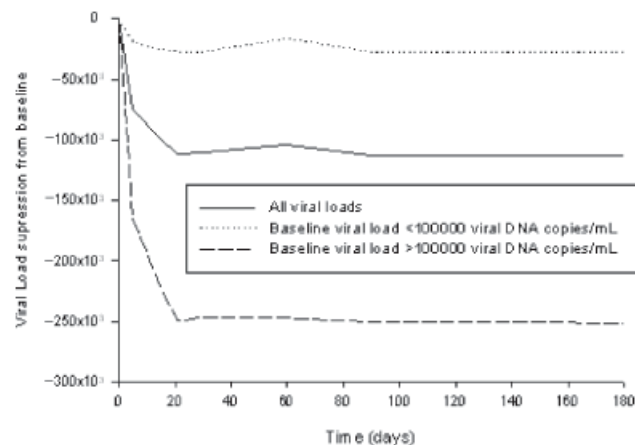


Fig. 1. Median viral load decay from baseline during the 180 days of the study in all patients, and in patients matched according to their viral load at baseline (<100,000 or ≥ 10,000 copies/mL).

Percentages of viral eradication or persistence of viremia on day 21 in patients of each risk group considered for cytomegalovirus (CMV) infection/disease

Risk group	Viral load eradication on day 21	Persistent CMV viral load on day 21
	66.7% (14 of 21 patients)	33.3% (7 of 21 patients)
Low risk	87.5% (7 of 8)	12.5% (1 of 8)
ATG/AR	57.1% (4 of 7)	42.9% (3 of 7)
CMV serostatus D + /R –	50% (3 of 6)	50% (3 of 6)

No statistically significant differences could be found between the 3 groups when compared ($P = 0.299$).
 ATG/AR, polyclonal anti-thymocyte globulin/anti-rejection therapies; D + , donor CMV positive; R – , recipient CMV negative.

Table 4

found in E_{\max} values when the groups of patients with high and low baseline viral loads were compared.

Evolution of patients during the follow-up period: persistence of eradication, asymptomatic recurrences, and CMV clinical infection recurrences

Table 5 shows the results corresponding to the evolution of patients with viral eradication or persistence on day 21, during the follow-up period. Three of 21 patients (14.3%) showed CMV clinical infection recurrences, with 4 episodes. The percentage of patients persisting negative after viral eradication on day 21 was higher than the percentage of patients with asymptomatic virological or recurrent CMV infection. A similar tendency was observed for patients that persisted positive on day 21; the percentage of them becoming spontaneously negative after that date was higher than those that showed recurrent CMV infection. All the patients with CMV clinical infection recurrences belonged to the D + /R – serostatus group and 2 of them had not eradicated the virus on day 21. The data shown suggest a tendency toward a higher risk of CMV clinical infection recurrence for patients with persistence of viremia on day 21 with respect to those that eradicate the virus and also for patients of D + /R – serostatus. To be noted is that the median viral load in patients with CMV clinical infection recurrence at time of clinical recurrence was higher (49,200 DNA copies/mL, ranging from 18,900 to 496,000 DNA copies/mL) than in patients with asymptomatic virological recurrence (2383 DNA copies/mL ranging from 686 to 5220 DNA copies/mL). The median time to recurrence was 59 days from the onset of the CMV infection/disease (range 47–61 days).

Treatment of CMV clinical infection recurrences

Treatment of CMV recurrences, not previously established in the protocol was as follows; 3 of 4 episodes were managed with additional courses of IV GCV and either modification or decrease of immunosuppressive therapy and 1 episode was managed by reducing immunosuppression only.

Resistance

No GCV-resistance mutations were detected during the course of the study, and no mutations were detected after DNA sequencing of the UL97 and UL54 genes.

Safety

Reported adverse events related to GCV/valganciclovir during the treatment period were anemia in 8 of 21 patients (38%), leukopenia in 4 of 21 patients (19%), neutropenia in 2 of 21 patients (9.5%), transaminitis in 1 of 21 patients (4.8%), and pancytopenia in 1 of 21 patients (4.8%). All adverse events could be managed without withdrawing antiviral therapy, except a patient presenting pancytopenia that required valganciclovir withdrawal on day 15 of treatment.

Acute rejection episodes during follow-up appeared in 4 of 21 patients (19%).

Pharmacokinetic results

GCV pharmacokinetics was established in 20 out of the 21 patients included in the study, from which both pharmacokinetic profiles (IV and p.o.) were obtained. Figure 2 displays the mean \pm standard deviation (SD) GCV serum

Evolution of patients during the follow-up period depending on viral load eradication or persistence at the end of treatment (day 21) and risk factors for cytomegalovirus (CMV) infection/disease

Evolution during the follow-up period									
Viral load eradication on day 21 66.7% (14 of 21 patients)					Persistent CMV viral load on day 21 33.3% (7 of 21 patients)				
Evolution	Risk group				Evolution	Risk group			
	All patients	D + /R –	ATG/AR	Low		All patients	D + /R –	ATG/AR	Low
Persisted negative	64.3% (9 of 14)	–	33.3% (3 of 9)	66.9% (6 of 9)	Became negative spontaneously	71.4% (5 of 7)	20% (1 of 5)	60% (3 of 5)	20% (1 of 5)
Asymptomatic virological recurrence	28.6% (4 of 14)	50% (2 of 4)	25% (1 of 4)	25% (1 of 4)					
CMV clinical infection recurrence	7.1% (1 of 14)	100% (1 of 1)	–	–	CMV clinical infection recurrence	28.2% (2 of 7)	100% (2 of 2)	–	–

D + /R – , CMV serostatus donor positive/recipient negative; ATG/AR, polyclonal anti-thymocyte globulin/anti-rejection therapies.

Table 5

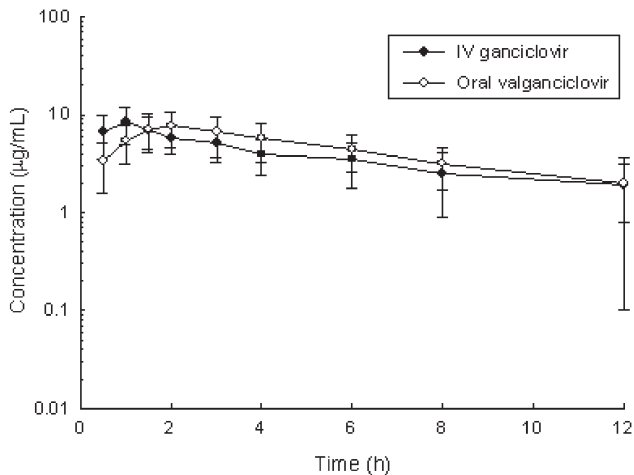


Fig. 2. Mean \pm standard deviation of steady-state ganciclovir (GCV) serum concentrations versus time (post-dosing time) after intravenous (IV) GCV (day 5) and oral valganciclovir (day 15) in solid organ transplantation patients.

levels found after IV GCV and p.o. valganciclovir at steady-state in all patients. The mean \pm SD values of exposures to GCV after IV GCV and p.o. valganciclovir are summarized in Table 6. No statistically significant differences ($P = 0.054$) were found between these values. Bioavailability of p.o. valganciclovir with respect to IV GCV is also displayed in Table 6. GCV accumulation was not observed, as accumulation rates calculated for each dosing regimen were in all cases inferior to 2.

Discussion

GCV given intravenously for 5 days followed by p.o. valganciclovir during 16 days showed efficacy and safety in

Comparative mean \pm standard deviation of exposure (AUC) values obtained after administration of intravenous (IV) ganciclovir and oral valganciclovir in solid organ transplant patients with cytomegalovirus infection/disease

Parameter	IV ganciclovir ¹	Oral valganciclovir ¹
AUC ² ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	46.71 \pm 23.81	55.00 \pm 19.53
F	NA	0.68 \pm 0.24

¹IV ganciclovir and oral valganciclovir doses administered were adjusted according to individual renal function as per the manufacturer's recommendations (see Table 1).

²No statistically significant differences were found between IV ganciclovir and oral valganciclovir ($P = 0.054$).

AUC, area under the serum concentration–time curve between dosing intervals; F, bioavailability of oral valganciclovir with respect to IV ganciclovir, estimated from the ratio of the dose normalized AUC of valganciclovir (expressed as ganciclovir equivalents) and dose normalized AUC of IV ganciclovir; NA, not available.

Table 6

kidney, liver, and heart transplant recipients with CMV infection/disease. This pilot study showed viral eradication in 66.7% of patients at the end of the treatment. The rate of success of this 21-day therapeutic course was similar to that of previous studies with similar or longer treatment duration. In effect, Humar et al. (32) found success rates of 46.9% after IV GCV for 20.5 ± 10.2 days and 50% after p.o. valganciclovir for 20.2 ± 12.7 days. The VICTOR study (10) provided viral eradication in 67.1% using IV GCV for 21 days followed by valganciclovir for 28 days and in 70.1% using valganciclovir for 49 days. A trend toward increased persistence of viral load on day 21 for patients with D + /R – serostatus or receiving anti-rejection therapy or polyclonal ATG was found. In fact, 50% of patients showing D + /R – serostatus and 42.9% receiving anti-rejection therapy or polyclonal ATG had persistent viremia at the end of the treatment, as compared to only 12.5% of patients with low accumulation risk factors. However, this tendency was not statistically significant probably due to the small sample size because of the exploratory nature of our pilot trial. On the other hand, statistically significant differences were found in median viral load baseline values of patients with persistent viremia with respect to patients with viral eradication on day 21, in agreement with previously reported work (10). A slight trend toward faster viral eradication was observed in patients with low baseline values versus patients with high baseline values.

The rate of CMV clinical infection recurrences (14.3%) was similar to the rates reported previously (from 22% to 33%) (33–35). On the other hand, we also observed a higher CMV clinical infection recurrence in patients with factors for persistence of viremia at the end of treatment (CMV serostatus D + /R – and either induction therapy with polyclonal ATG or anti-rejection therapy). The majority of asymptomatic and symptomatic CMV recurrences occurred in the group of patients at risk of primary infection (D + /R – serostatus). To be noted, the symptomatic recurrent episodes were associated with higher baseline CMV levels compared with asymptomatic virological recurrences. On the other hand, recurrences could not be apparently related to GCV resistance because no mutations were detected in any case.

The low number of patients of this pilot study does not allow us to make a definitive recommendation. However, we have observed that a 3-week antiviral course provides similar rates of clinical and viral response as those reported in trials with longer duration.

The combination of IV GCV and p.o. valganciclovir may be a useful strategy for short hospital admittances and early discharges after an initial viral remission and a close monitoring of these patients. This strategy might really reduce the global cost of CMV therapy in transplant programs.

The pharmacokinetic study comparing GCV exposures using IV GCV or p.o. valganciclovir showed comparable AUC values ($P = 0.054$), although they were slightly higher for p.o. valganciclovir than for IV GCV. This fact did not seem to be attributable to the accumulation of GCV secondary to previous IV administration of this agent. The AUC values after p.o. valganciclovir in our study ($55.00 \pm 19.53 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$) were also comparable although slightly higher than those reported by Wiltshire et al. (36) in SOT patients receiving prophylactic treatment ($46.3 \pm 15.2 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$). Therefore, the population pharmacokinetic model recently developed by our group (30) shows that dose adjustments by using a Bayesian prediction may help in reaching adequate GCV exposures.

In conclusion, our pilot study suggests that a short course combining initial IV GCV and subsequent p.o. valganciclovir may provide effective therapy in the treatment of CMV infection/disease in SOT recipients with adequate drug exposure. An additional potential benefit of this strategy may be the shortening of the length of hospital stay, which may result in cost reduction and better patient comfort. Larger studies with adequate power might properly address our preliminary observations.

Acknowledgements:

We would like to thank the Biochemistry Department (Hospital Vall d'Hebron) for their help in determining GCV plasma concentrations, and the nurses of the Nephrology Department of Hospital de Bellvitge, Barcelona (María Sarrías, Mar Blazquez, and Ester Díaz) for their technical support in the GCV/valganciclovir administration and blood sampling. We also thank Anne-Marie Stephani of Wolters Kluwer Health for editorial assistance with the preparation of this manuscript.

References

1. Tolckoff-Rubin NE, Rubin RH. Recent advances in the diagnosis and management of infection in the organ transplant recipient. *Semin Nephrol* 2000; 20 (2): 148–163.
2. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007; 357 (25): 2601–2614.
3. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004; 66 (1): 329–337.
4. Yuen GJ, Drusano GL, Fletcher C, et al. Population differences in ganciclovir clearance as determined by nonlinear mixed-effects modelling. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39 (10): 2350–2352.
5. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant* 2005; 5 (2): 218–227.
6. Pescovitz MD. Formulary considerations for drugs used to prevent cytomegalovirus disease. *Am J Health Syst Pharm* 2003; 60 (23, Suppl 8): S17–S21.
7. McGavin JK, Goa KL. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 2001; 61 (8): 1153–1183.
8. Pescovitz MD, Rabkin J, Merion RM, et al. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (10): 2811–2815.
9. Paya C, Humar A, Dominguez E, et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4 (4): 611–620.
10. Asberg A, Humar A, Rollag H, et al. VICTOR Study Group. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7 (9): 2106–2113.
11. Razonable RR, Emery VC. Management of CMV infection and disease in transplant patients. *Herpes* 2004; 11 (3): 77–86.
12. Scott JC, Partovi N, Ensom MH. Ganciclovir in solid organ transplant recipients: is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit* 2004; 26 (1): 68–77.
13. Turgeon N, Fishman JA, Doran M, et al. Prevention of recurrent cytomegalovirus disease in renal and liver transplant recipients: effect of oral ganciclovir. *Transpl Infect Dis* 2000; 2 (1): 2–10.
14. Pereyra F, Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17 (4): 357–361.
15. Fellay J, Venetz JP, Aubert JD, et al. Treatment of cytomegalovirus infection or disease in solid organ transplant recipients with valganciclovir. *Transplant Proc* 2005; 37 (2): 949–951.
16. Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD, et al. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005; 79 (11): 1477–1483.
17. Pescovitz MD. Oral ganciclovir and pharmacokinetics of valganciclovir in liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 1999; 1 (Suppl 1): 31–34.
18. Niubo J, Perez JL, Martinez-Lacasa JT, et al. Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24 (1): 19–24.
19. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16 (1): 31–41.
20. Humar A, Michaels M. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6 (2): 262–274.
21. Niubo J, Perez JL, Carvajal A, et al. Effect of delayed processing of blood samples on performance of cytomegalovirus antigenemia assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (4): 1119–1120.
22. Erice A, Gil-Roda C, Pérez JL, et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis* 1997; 175 (5): 1087–1092.
23. Erice A, Gil-Roda C, Perez JL, et al. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12 (2): 286–297.
24. Cihlar T, Fuller MD, Cherrington JM. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses

- generated from overlapping DNA fragments. *J Virol* 1998; 72 (7): 5927–5936.
25. National Cancer Institute. Guidelines and tools for protocol development. National Cancer Institute, Rockville, MD 2006.
 26. Pou LCF, Almirante B, Pascual C. A rapid liquid chromatographic (HPLC) method for determination of ganciclovir in serum. In: Galteau MM, Siest G, Henny J, eds. *Biology Prospective. Comptes rendus du 8^o colloque de Pont-a-Mousson*. Paris, France: John Libbey Eurotext, 1993: 183–186.
 27. Cope AV, Sabin C, Burroughs A, et al. Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor–recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. *J Infect Dis* 1997; 176 (6): 1484–1490.
 28. Pharsight Corp CU. WinNonlin analytical software. Professional version 3.3. Pharsight Corp, Mountain View, California.
 29. Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics* (2nd edn). New York, USA: Marcel Dekker, 1982: 84–111.
 30. Caldes A, Colom H, Amendariz Y, et al. Population pharmacokinetics of ganciclovir after intravenous ganciclovir and oral valganciclovir administration in solid organ transplant patients infected with cytomegalovirus. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 (11): 4816–4824.
 31. DuBois D, DuBois EF. Clinical calorimetry: tenth paper. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Intern Medicine* 1916; 17 (6.2): 863–871.
 32. Humar A, Siegal D, Moussa G, Kumar D. A prospective assessment of valganciclovir for the treatment of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *J Infect Dis* 2005; 192 (7): 1154–1157.
 33. Sawyer MD, Mayoral JL, Gillingham KJ, et al. Treatment of recurrent cytomegalovirus disease in patients receiving solid organ transplants. *Arch Surg* 1993; 128 (2): 165–169; discussion 170.
 34. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis* 2002; 186 (6): 829–833.
 35. Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J Infect Dis* 2000; 181 (2): 717–720.
 36. Wiltshire H, Hirankarn S, Farrell C, et al. Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir, in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44 (5): 495–507.

Capítulo 2:

Caldés A, Colom H, Armendariz Y, Garrido MJ, Troconiz IF, Gil-Vernet S, Lloberas N, Pou L, Peraire C, Grinyó JM. Population pharmacokinetics of ganciclovir after intravenous ganciclovir and oral valganciclovir administration in solid organ transplant patients infected with cytomegalovirus. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Nov;53(11):4816-24.

doi: 10.1128/AAC.00085-09. Epub 2009 Sep 8. PubMed PMID: 19738014;
PubMed Central PMCID: PMC2772326.

Population Pharmacokinetics of Ganciclovir after Intravenous Ganciclovir and Oral Valganciclovir Administration in Solid Organ Transplant Patients Infected with Cytomegalovirus[∇]

A. Caldés,¹ H. Colom,^{2*} Y. Armendariz,¹ M. J. Garrido,³ I. F. Troconiz,³ S. Gil-Vernet,¹
N. Lloberas,¹ L. Pou,⁴ C. Peraire,² and J. M. Grinyó¹

Nephrology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain¹; Department of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, School of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain²; Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Navarra, Pamplona, Spain³; and Biochemistry Service, Hospital Vall D'Hebron, Barcelona, Spain⁴

Received 21 January 2009/Returned for modification 8 July 2009/Accepted 1 September 2009

A population pharmacokinetics analysis was performed after intravenous ganciclovir and oral valganciclovir in solid organ transplant patients with cytomegalovirus. Patients received ganciclovir at 5 mg/kg of body weight (5 days) and then 900 mg of valganciclovir (16 days), both twice daily with dose adjustment for renal function. A total of 382 serum concentrations from days 5 and 15 were analyzed with NONMEM VI. Renal function given by creatinine clearance (CL_{CR}) was the most influential covariate in CL. The final pharmacokinetic parameters were as follows: ganciclovir clearance (CL) was $7.49 \cdot (CL_{CR}/57)$ liter/h (57 was the mean population value of CL_{CR}); the central and peripheral distribution volumes were 31.9 liters and 32.0 liters, respectively; intercompartmental clearance was 10.2 liter/h; the first-order absorption rate constant was 0.895 h^{-1} ; bioavailability was 0.825; and lag time was 0.382 h. The CL_{CR} was the best predictor of CL, making dose adjustment by this covariate important to achieve the most efficacious ganciclovir exposure.

Cytomegalovirus (CMV), the most common opportunistic pathogen affecting solid organ transplant (SOT) patients (24), is associated with significant morbidity and mortality (25). Intravenous (i.v.) ganciclovir has been the gold standard for both prevention and treatment of CMV disease in SOT patients (20). The risk of neutropenia, the need for catheter access, and the costs and inconvenience of patient hospitalization after i.v. ganciclovir use have led to the development of oral formulations. Oral ganciclovir is effective in preventing CMV infection and disease, but its low bioavailability (F) limits the degree of viral suppression and may lead to the emergence of viral resistance (6, 18). The development of valganciclovir, an orally available ester prodrug of ganciclovir, has overcome the low F of ganciclovir (7). Following oral intake, the majority of valganciclovir is rapidly converted to ganciclovir by intestinal and hepatic esterases. Ganciclovir is entirely cleared by renal excretion (7).

The efficacy and safety of oral valganciclovir (900 mg) for the treatment of CMV disease in SOT patients have been shown to be comparable to the efficacy and safety of i.v. ganciclovir (5 mg/kg of body weight) when both drugs were given twice daily for 21 days and followed by 900 mg of valganciclovir daily for 28 days (1, 2).

The pharmacokinetics of ganciclovir after i.v. ganciclovir and/or oral valganciclovir administration have been studied in different patient populations (4, 8, 11, 28, 29). Some authors (21) have demonstrated equivalence between different single

doses of oral ganciclovir and valganciclovir and i.v. ganciclovir using noncompartmental pharmacokinetic analysis. However, this approach cannot provide a clinically applicable model for dose adjustment. Such a model would be very useful to achieve the required ganciclovir exposure to ensure efficacy and avoid hematological adverse events and/or CMV resistance. It could be the prerequisite step for characterization of the relationship between ganciclovir exposure and viral eradication. In a previous study of SOT recipients with donor-positive/recipient-negative CMV serostatus (27), viremia was suppressed during prophylaxis with ganciclovir exposure values of 40 to 50 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ and there was only a weak tendency to increased neutropenia and leukopenia with higher ganciclovir exposure. Therefore, dose adjustment could be based on this exposure value. Yuen et al. (29) have described the population pharmacokinetics of ganciclovir in kidney transplant and human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients. Wiltshire et al. (26) also described the population pharmacokinetics of oral ganciclovir compared with those of valganciclovir in SOT patients. However, population studies dealing with pharmacokinetics of ganciclovir after i.v. ganciclovir followed by oral valganciclovir in SOT patients infected by CMV where drug disposition and F could be estimated are lacking.

The aims of this study were (i) to establish the population pharmacokinetics of ganciclovir after i.v. ganciclovir followed by oral valganciclovir in SOT patients infected by CMV; (ii) to evaluate the effects of several physiopathological factors on the disposition kinetics of ganciclovir and to find potential predictive factors for dosage individualization; and (iii) to evaluate the effectiveness of the manufacturer's recommended adjusted dose in preventing under- or overexposure in SOT patients.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, School of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-4024560. Fax: 34-93-4024563. E-mail: helena.colom@ub.edu.

[∇] Published ahead of print on 8 September 2009.

TABLE 1. Dosing adjustments based on glomerular filtration rate in the solid organ transplant population^a

Drug	CL _{CR} (ml/min)	Dose (mg/kg)/interval (h)
Ganciclovir	>50	5/12
	25–50	2.5/12
	<25	2.5/24
Valganciclovir	≥60	900/12
	40–59	450/12
	25–39	450/24
	10–24	450/48

^a The glomerular filtration rate was calculated using the Cockcroft-Gault formula.

MATERIALS AND METHODS

Study design. A prospective clinical trial performed according to good clinical practice and in accordance with the Declaration of Helsinki was carried out at the Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain, between March 2004 and February 2006. All patients provided written informed consent (clinicaltrials.gov identifier NCT00730769).

Patients with established CMV infection undergoing allogeneic SOT (kidney, liver, or heart) were eligible for inclusion if they were ≥18 years old and presented with positive CMV antigenemia (pp65) defined as ≥20 positive cells/10⁵ peripheral blood mononuclear cells. Patients with severe CMV tissue-invasive disease, absolute neutrophil counts of <500/mm³, platelet counts of <25,000/mm³, hemoglobin at <80 g/liter, or estimated glomerular filtration rates of <10 ml/min (according to the Cockcroft-Gault formula [9]) were excluded. Demographic characteristics such as age, gender, weight, transplant type, clinical laboratory measurements (creatinine [CR] and CR clearance [CL_{CR}] estimated according to the Cockcroft-Gault formula [5]), and concomitant immunosuppressive medication were recorded.

Ganciclovir/valganciclovir administration. Patients received i.v. ganciclovir (Cymeve; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) at 5 mg/kg over 1 h twice daily for 5 days followed by 900 mg of oral valganciclovir (Valcyte; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) twice daily for 16 days (21 days of treatment). For patients with impaired renal function, i.v. and oral doses were adjusted by CL_{CR} (Cockcroft-Gault formula [5]) in accordance with the manufacturer's recommendations (Table 1).

Blood sampling and drug analysis. Blood samples were collected before and at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 h after dosing on treatment days 5 (after i.v. ganciclovir) and 15 (after oral valganciclovir). Further sampling to 24 h was performed in one patient with CL_{CR} values of 10 ml/min (day 5) and 16 ml/min (day 15). Time deviations were taken into account in the pharmacokinetic analysis. Blood samples were centrifuged, and serum samples collected and stored at –20°C until analysis. Ganciclovir concentrations were measured by high-performance liquid chromatography with UV detection, according to a previously validated method (22). Linearity was shown over a range of 0.5 to 30 µg/ml, with an intra- and interassay precision of <7.0% and an accuracy of <5%. The lower limit of quantification was 0.5 µg/ml.

Pharmacokinetic data analysis. Pharmacokinetic data were analyzed simultaneously using NONMEM (nonlinear mixed-effects modeling) software, version VI (3). As NONMEM estimated the pharmacokinetic parameters of ganciclovir, valganciclovir doses were converted to their equivalent ganciclovir content by multiplying the valganciclovir dose by 0.720 (corresponding to the ratio between the molecular weights of ganciclovir and valganciclovir).

The modeling process consisted of the following three steps: (i) development of the base pharmacokinetic model, incorporating interoccasion variability; (ii) covariate selection; and (iii) model validation. The first-order conditional estimation method with interaction was used throughout the entire model-building process.

Base population pharmacokinetics model. Models of one and two open compartments with first-order absorption were evaluated, as well as models with and without lag time. The standard lag time models and the transit compartment models (23) were tested to describe the absorption profile. Interpatient and interoccasion (16) variability were assumed to have a log-normal distribution. Additive, proportional, and combined (additive plus proportional) models were compared to assess the residual error (RE) in drug concentrations. The individual contribution to the RE was accounted for by including an interpatient variability term in the RE model when first-order conditional estimation with interaction was applied (14). This term was implemented as an exponential

TABLE 2. Demographic and clinical characteristics of the population studied^a

Patient characteristic ^b	All	Type of transplant		
		Kidney	Liver	Heart
No. of patients	20	10	5	5
Weight (kg)	66.2 (12.9)	65.9 (12.9)	69.6 (10.8)	65.8 (5.5)
Age (yr)	55.7 (11.8)	54.6 (10.3)	53.2 (8.7)	54.4 (17.3)
CL _{CR} (ml/min)	57.0 (25.3)	39.9 (22.9)	75.1 (18.0)	73.2 (5.5)
Gender (male/female)	10/10	4/6	2/3	4/1
Concomitant immunosuppressive medication				
MMF (yes/no)	16/4	9/1	4/1	5/0
CsA (yes/no)	11/9	3/7	4/1	4/1
TAC (yes/no)	8/12	6/4	1/4	1/4
SRL (yes/no)	1/19	1/9	0/5	0/5

^a Data are given as mean (standard deviation) values or counts.

^b CsA, cyclosporine; MMF, mofetil; SRL, sirolimus; TAC, tacrolimus. CL_{CR} was estimated according to the Cockcroft-Gault formula.

model in the RE model (17). The adequacy of the models developed was evaluated by (i) changes in the minimum objective function value [$-2 \log$ (likelihood); MOFV] obtained in NONMEM VI; (ii) the precision of the parameter estimates; and (iii) goodness-of-fit plots. For nested models, the ratio of the MOFV is asymptotically chi-square distributed, with degrees of freedom equal to the difference in the number of model parameters. A significance level of 0.05% denoted a significant improvement of fit (drop in the MOFV by >7.879) for a one-parameter difference. Goodness-of-fit was evaluated through plots of typical population model-predicted or individual Bayesian predicted concentrations versus observed concentrations or plots of conditional weighted residuals versus time (12). The Xpose program (13), version 4.0, was used to guide the model-building process.

Covariate model. The effects of all physiologically reasonable covariates, summarized in Table 2, on model parameters were investigated by plotting empirical Bayes's estimates of pharmacokinetic parameters against covariates, using the generalized additive models procedure (13), and then testing all of them with NONMEM.

Covariates were first tested univariately in the model and then by the cumulative forward inclusion/backward elimination procedures. Significance levels of 5% (reduction in the MOFV of >3.841 points) and 1% (increase in the MOFV of >6.635 points) were employed during the forward addition and backward elimination steps. A decrease of at least 10% in interpatient variability associated with a specific pharmacokinetic parameter was considered clinically relevant for the inclusion of that specific covariate. All evaluated relationships between pharmacokinetic parameters and continuous covariates were centered around the mean. The covariates were introduced into the base model, in terms of linear relationships. Because the primary goal of the population pharmacokinetic analysis was to estimate individual patient ganciclovir pharmacokinetic parameters, the extent of Bayesian shrinkage was evaluated for each parameter in the final model using the following formula (15): shrinkage = $1 - (SD_{\eta \text{ parameter}} / \Omega_{\text{parameter}})$. In this formula, $SD_{\eta \text{ parameter}}$ is the standard deviation of the individual estimates of η (interpatient variability random effect) for each parameter and $\Omega_{\text{parameter}}$ is the estimate of the standard deviation of the estimated population variance. Large values of shrinkage would be associated with generally poor individual estimates of that parameter.

Model validation. The bootstrap method with replacement was used to assess the stability of the final model and to construct confidence intervals (CIs) of pharmacokinetic parameters (10), using PsN-Toolkit version 2.2.6 (19). Two hundred data sets were reconstructed by resampling from the original data. The final model was fitted to the replicate data sets, and parameter estimates for each of the replicate data sets were obtained. The mean values of the parameters obtained were compared with those estimated from the original data. The lower and upper limits of the 95% CI for each parameter accounted for its corresponding variability.

Model-based simulations. The simulated values of the area under the concentration-time curve (AUC) following (i) the manufacturer's dosing strategy taking into account a body weight of 66.2 kg (mean population value) and (ii) the i.v. dosing estimated as the target AUC (AUC_{target} ; 45 µg · hr/ml) multiplied by the population CL (CL_{pop} ; predicted by the final population model) or (iii) the oral dosing estimated as AUC_{target} multiplied by the ratio between CL_{pop} and population bioavailability (F_{pop} ; also predicted by the final population model) for 10

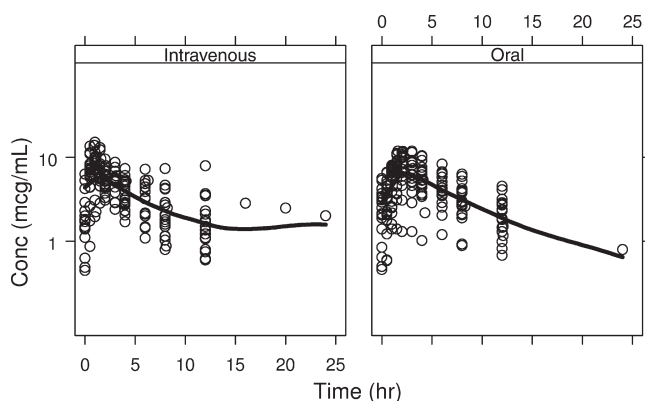


FIG. 1. Ganciclovir serum concentrations versus time postdose following i.v. administration of ganciclovir (left) and oral administration of valganciclovir (right) in SOT patients. Circles represent observed ganciclovir concentrations. Solid lines represent the smooth line indicating the general data trend.

different cutoffs of estimated CL_{CR} values (from 10 to 100 ml/min) were compared.

The simulated AUCs were calculated as dose/individual CL (for i.v. ganciclovir) or as individual $F \cdot$ dose/individual CL (for oral valganciclovir). AUC_{target} was estimated from the mean value of the AUC_{target} range proposed by Wiltshire et al. (27) in SOT patients. The percentages of patients achieving AUC_{target} were estimated in all cases. These simulations evaluated the competence of recommended CL_{CR} -adjusted doses regarding their ability to provide target exposure values following i.v. ganciclovir and oral valganciclovir treatment.

RESULTS

Patients. Twenty-one Caucasian patients with established CMV infections undergoing allogeneic SOT (kidney, liver, or heart) were eligible for inclusion in this study. One patient (liver transplantation) was excluded from the population pharmacokinetics analysis because this patient did not complete the treatment due to pancytopenia.

Baseline demographic and clinical data for all patients, separated by SOT type, are summarized in Table 2. Dose adjustment according to renal function followed the manufacturer's recommendations (Table 1) with the exception of four patients: one with a CL_{CR} of 27 ml/min who received i.v. ganciclovir at 5 mg/kg twice per day; one patient with a CL_{CR} of 55 ml/min who received 900 mg of oral valganciclovir twice per day; and two patients with CL_{CR} values of 38 and 25 ml/min, respectively, who received 450 mg of oral valganciclovir twice per day.

Ganciclovir serum levels. The time profiles of ganciclovir serum levels following i.v. ganciclovir and oral valganciclovir administration are displayed in Fig. 1. The smooth line shows the general trend of the data, and the sampling points adequately define the overall pharmacokinetics profiles of ganciclovir after both i.v. and oral administration. The final data set used for the pharmacokinetics analysis consisted of 382 ganciclovir concentrations, 190 from i.v. ganciclovir and 192 from oral valganciclovir. Only six samples were below the limit of quantification.

Population pharmacokinetics model. (i) Base population pharmacokinetics model. The pharmacokinetic disposition of ganciclovir was best described by a two-compartment open linear model with first-order absorption process and lag time,

parameterized in terms of total ganciclovir CL, central compartment distribution volume (V_1), intercompartmental clearance, peripheral compartment distribution volume (V_2), first-order absorption rate constant (k_a), F , and lag time. The k_a represents both absorption and hydrolysis of valganciclovir in the gut wall and liver, before reaching the systemic circulation. The transit compartment model for modeling the absorption/metabolism process did not result in further improvement of the model. The pharmacokinetic parameters estimated from the base model are listed in Table 3. The logit transformation was applied to F to restrain its estimate values between 0 and 1. Interpatient variability could be included in CL, V_1 , k_a , and F . Consideration of interoccasion variability in disposition pharmacokinetic parameters did not significantly reduce MOFV ($P > 0.05$). RE was described by a combined error model where the proportional part estimated in terms of variance was 0.144 or 37.95% (expressed as coefficient of variation [CV%]) and the additive part in terms of a standard deviation was 0.475 μ g/ml. The inclusion of interpatient variability in the RE model resulted in a decrease in MOFV of 43.43 points and was estimated to be 0.099 (expressed as variance) or 31.46% (expressed as CV%). In addition to resulting in an improvement in individual fits, this led to a marked decrease in the proportional residual variability of 24.21%.

(ii) Covariate analysis. When covariates were tested univariately, the inclusion of CL_{CR} reduced the MOFV by -33.478 ($P < 0.001$) and contributed to a decrease of interpatient variability in ganciclovir CL from 68.19% to 32.71%, with CL_{CR} explaining the 52.03% interpatient variability in CL. The inclusion of gender and the coadministration of tacrolimus decreased the MOFV by 9.196 ($P < 0.01$) and 6.354 points ($P < 0.05$), respectively. The inclusion of body weight in CL was not statistically significant and explained only 4.74% of the interpatient variability in this parameter. According to these results, CL_{CR} was the most influential covariate on CL. Cumulative inclusion of gender in the CL_{CR} covariate model failed to cause a further significant drop in the MOFV (-1.289 , $P > 0.05$). After incorporation of tacrolimus administration or body weight in the CL_{CR} covariate model, an increase in the MOFV was observed in both cases. During the backward elimination, exclusion of any of these covariates, one at a time, from the CL_{CR} model did not result in a significant increase in the MOFV. Therefore, a model which regarded CL_{CR} as the predictor variable of ganciclovir CL was the most suitable, from both a statistical and clinical viewpoint. In addition, CL_{CR} explained the majority of interpatient variability in CL, providing good estimates and significance for all pharmacokinetic parameters.

Figure 2 shows the goodness-of-fit plots, demonstrating that the measured and model-predicted concentrations were in good general agreement for both methods of administration (i.v. and oral). Neither treatment showed a specific trend for conditional weighted residuals versus time.

Figure 3 shows superimposed values of the observed, individually predicted, and population-predicted ganciclovir serum concentrations observed in two patients of the population studied, showing CL_{CR} values of 73 ml/min (median) and 38 ml/min (low), respectively, after both i.v. ganciclovir and oral valganciclovir administration. These plots support the fact that the final model satisfactorily fits the data.

TABLE 3. Ganciclovir population pharmacokinetic parameter estimates for the base and final models and bootstrap results for the final model^a

Parameter	Unit of measure	Base model parameter estimate (relative SE)	Final model parameter estimate (relative SE)	Mean (95% CI) bootstrap results ^b
Pharmacokinetic parameters				
CL	Liter/h	6.34 (15.93)	7.49 (7.76) · (CL _{CR} /57) ^c	7.48 (6.27–8.71)
V ₁	Liter	32.0 (13.28)	31.90 (9.81)	32.76 (21.93–41.87)
CL _D	Liter/h	9.65 (18.13)	10.20 (11.86)	9.80 (6.47–13.93)
V ₂	Liter	31.1 (19.23)	32.0 (17.78)	32.93 (11.57–52.42)
k _a	h ⁻¹	0.971 (18.43)	0.895 (10.77)	0.91 (0.546–1.244)
F		0.760 (6.99)	0.825 (7.07)	0.81 (0.698–0.952)
Lag time	h	0.395 (3.67)	0.382 (4.69)	0.38 (0.34–0.42)
Interpatient variability in^d:				
CL		0.466 (26.39)	0.107 (40.56)	0.106 (0.027–0.187)
V ₁		0.239 (61.09)	0.227 (63.00)	0.208 (–0.045–0.499)
k _a		0.478 (39.96)	0.464 (36.85)	0.446 (0.068–0.860)
F		0.026 (48.58)	0.049 (63.90)	0.060 (–0.014–0.352)
Residual variability				
σ ₁	μg/ml	0.475 (24.84)	0.465 (15.74)	0.453 (0.235–0.695)
σ ₂ ²		0.144 (24.58)	0.143 (19.30)	0.145 (0.069–0.217)
ω _{RE} ²		0.099 (59.84)	0.116 (54.48)	0.134 (–0.048–0.28)

^a CL_D, intercompartmental clearance between central and peripheral compartments; σ₁, standard deviation of additive component of residual variability; σ₂², variance of proportional component of residual variability; ω_{RE}², interpatient variability in residual error.

^b Derived from 200 successful bootstrap sample runs.

^c CL_{CR}, creatinine clearance, estimated with the Cockcroft-Gault formula (ml/min); 57 = mean population CL_{CR} value (ml/min).

^d Estimates of interpatient variability are expressed as variance values (ω²).

The parameter estimates corresponding to the final model are also listed in Table 3. Interpatient variability values for CL were decreased in the final model (interpatient variability of 0.107, expressed as variance, or 32.71%, expressed as CV%)

compared with the values for the base model (interpatient variability of 0.466, expressed as variance, or 68.26%, expressed as CV%). Residual variability and interpatient variability in RE were, in both cases, comparable and estimated

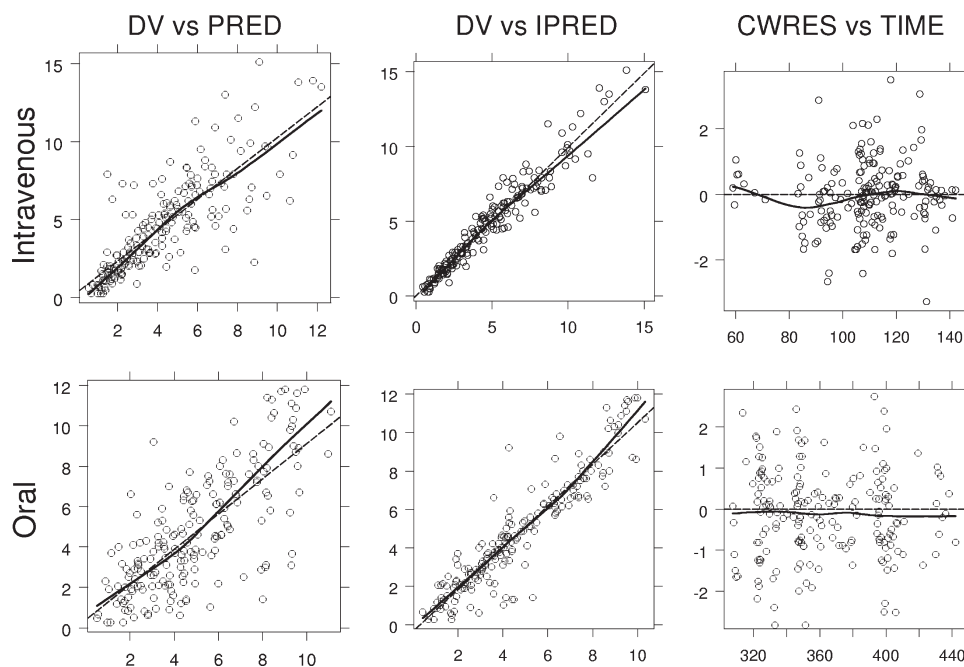


FIG. 2. Goodness-of-fit plots for the population pharmacokinetics model. Upper panels show results for i.v. administration of ganciclovir and lower panels show results for oral administration of valganciclovir. Ganciclovir concentrations are given in μg/ml and time in hours from the start of the treatment. DV, observed concentrations; PRED, population predictions; IPRED, individual predictions; CWRES, conditional weighted residuals; dashed line, identity line; solid line, smooth line indicating the general trend of the data.

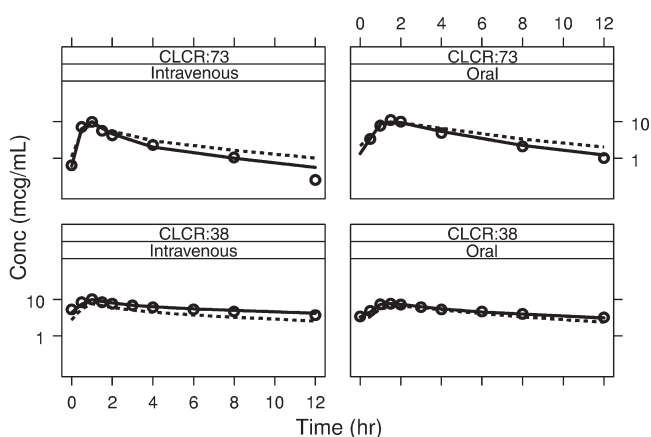


FIG. 3. Superimposed values of the observed (DV, open circles), individually predicted (IPRED, solid line), and population-predicted (PRED, dashed lines) ganciclovir serum concentrations versus time postdose in two patients belonging to the population studied, showing CL_{CR} values of 73 and 38 ml/min, respectively, after both i.v. ganciclovir (left) and oral valganciclovir (right) administration.

with similar precision with respect to the base model (Table 3). Estimates of the shrinkage for all the pharmacokinetic parameters were less than 17%, suggesting that in all the cases, the individual estimates were reasonably robust.

Figure 4 shows the relationship between ganciclovir exposure predicted by the developed model versus CL_{CR} after i.v. ganciclovir and oral valganciclovir administration in SOT patients. These results show a tendency to higher ganciclovir systemic exposure after valganciclovir compared to that after i.v. ganciclovir specifically for patients showing CL_{CR} values of 60 ml/min and higher.

Model validation. Table 3 lists results corresponding to the means and 95% CIs of parameter bootstrap estimates. The

parameter values for the final model generated from the bootstrap analysis were similar to those of the model developed using the 20 patients in this study. The percentage of difference between the final model and mean bootstrap sample data was lower than 8.5% for all the structural pharmacokinetic and random-effect parameters, with the exception of interpatient variability in RE, where the difference was 15.64%. All final model estimates lie within the 95% CI of the bootstrap values. These results indicate that the estimates for the fixed and random effects in the final model are accurate and that the model is stable.

Model-based simulations. Figure 5 shows the simulated ganciclovir serum levels and 95% CIs for three estimated CL_{CR} values (low, 20 ml/min; median, 60 ml/min; and high, 90 ml/min) following the administration of i.v. ganciclovir and oral valganciclovir according to the adjusted manufacturer's recommended dose (Table 1). A tendency toward lower model-predicted concentrations with higher CL_{CR} values, more noticeable after i.v. administration than after oral administration, is shown.

Table 4 summarizes the average predicted AUC and 95% CI values using (i) the manufacturer's recommended dosing strategy, taking into account a body weight of 66.2 kg (mean population value), and (ii) the dose adjustment strategy based on $AUC_{target} \cdot CL_{pop}$ (for i.v. administration) or $AUC_{target} \cdot (CL_{pop}/F_{pop})$ (for oral administration) for 10 different cutoffs of estimated CL_{CR} values (from 10 to 100 ml/min). The percentages of patients achieving AUC_{target} after each strategy/administration route are also shown. The dose adjustment strategy (based on AUC_{target} in the simulations) resulted in a decreased range of AUCs with respect to those resulting from the manufacturer's recommended strategy for both i.v. and oral administration.

The percentages of patients with AUCs over the target after

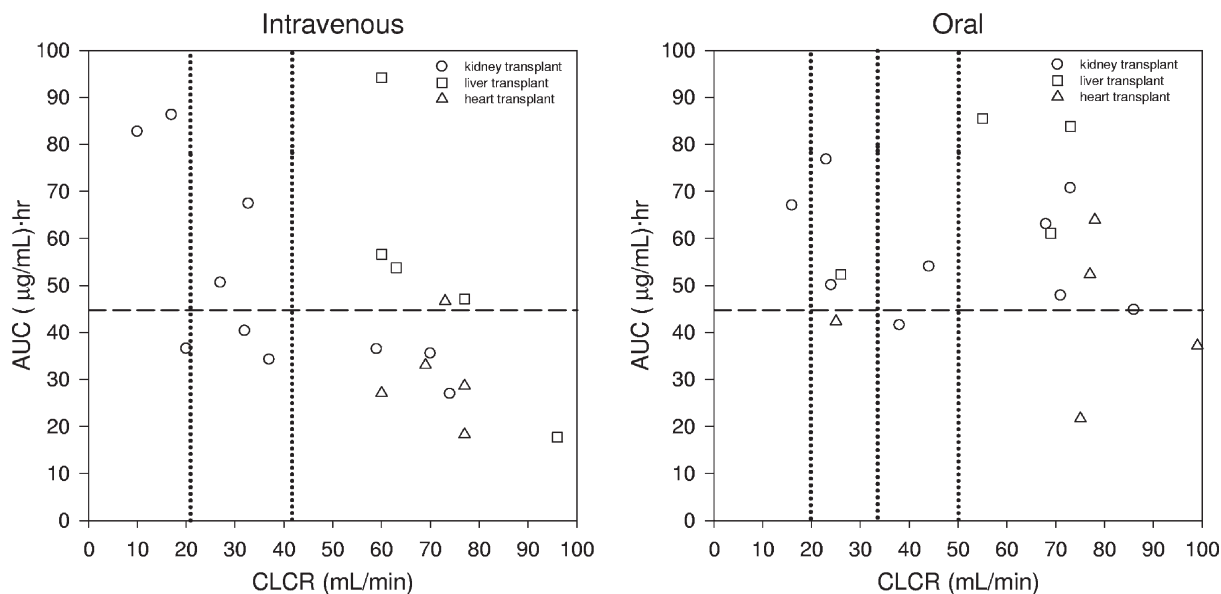


FIG. 4. Relationship between ganciclovir exposure (AUC) and estimated CL_{CR} in SOT patients after administration of i.v. ganciclovir (left) and oral valganciclovir (right) according to the manufacturer's recommended dosage. Vertical lines show dosage adjustments based on CL_{CR} . Horizontal lines show the AUC_{target} value that was considered efficacious.

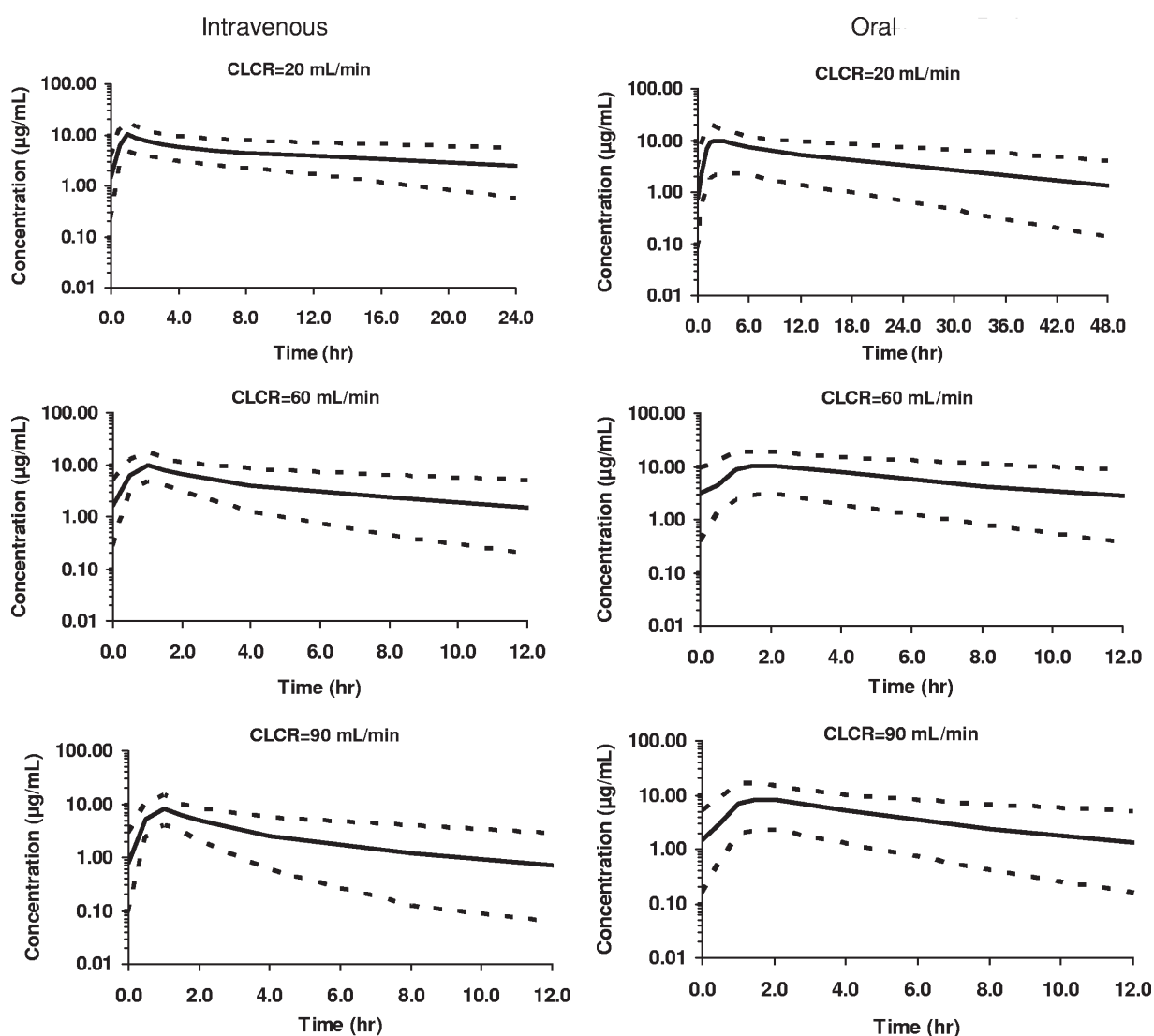


FIG. 5. Simulated ganciclovir serum concentrations versus time. Mean and 95% CIs obtained from 1,000 simulations of ganciclovir serum concentration-time profiles after i.v. administration of ganciclovir (left) and oral administration of valganciclovir (right) to patients showing CL_{CR} values of 20, 60, and 90 mL/min and 66.2 kg of body weight and treated according to the manufacturer's recommendations. Solid lines show 50th-percentile mean predictions, and dotted lines show 2.5th and 97.5th percentiles.

the manufacturer's recommended strategy were in general higher after oral administration than after i.v. administration for patients with CL_{CR} values of 20 mL/min and up. The highest percentages of patients with AUCs over the target were observed at CL_{CR} values of <30 mL/min after both i.v. and oral administration.

DISCUSSION

Considerable variability exists regarding the pharmacokinetics of ganciclovir following i.v. ganciclovir and oral valganciclovir administration in SOT patients. This study was undertaken to develop a clinically applicable population pharmacokinetics model to quantify inter- and inpatient variability and to analyze the effects of physiopathological factors on the pharmacokinetics of ganciclovir, with the aim of explaining the observed variability.

Therapeutic drug monitoring of ganciclovir after valganciclovir administration is not employed in the treatment of SOT patients infected with CMV. A previous study demonstrated viremia suppression during prophylaxis with ganciclovir exposure (AUC) of 40 to 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}/\text{hr}$ (27), suggesting that dose adjustment to a target exposure value would justify the development of a clinically applicable population pharmacokinetics model. To date, no pharmacokinetics/pharmacodynamics relationship or target exposure (AUC) values have been established for the treatment of CMV disease in infected SOT patients. The current study represents a first step toward developing optimal ganciclovir dosing schedules for the treatment of CMV disease on the basis of a pharmacokinetics/pharmacodynamics relationship.

The pharmacokinetic disposition of ganciclovir was best described by a two-compartment open linear model with first-

TABLE 4. Mean predicted AUC values from different simulated dosing strategies for patients, showing various estimated CL_{CR} values and percentages of patients achieving AUC_{target} ^a

CL_{CR} (ml/min)	Value predicted using:							
	Initial dosing according to manufacturer's instructions				Dose adjustment according to ^b :			
	IV		Oral		$AUC_{target} \cdot CL_{pop}$		$AUC_{target} \cdot (CL_{pop}/F_{pop})$	
	AUC (95% CI)	% of patients achieving target	AUC (95% CI)	% of patients achieving target	AUC (95% CI)	% of patients achieving target	AUC (95% CI)	% of patients achieving target
10	128.74 (67.88–247.90)	100.0	190.35 (71.31–393.63)	98.8	44.70 (23.72–86.93)	49.5	41.15 (14.31–85.07)	41.3
20	62.12 (34.85–123.22)	83.6	93.46 (30.94–196.96)	92.4	44.46 (23.93–84.19)	48.9	40.46 (15.53–90.96)	40.0
30	41.30 (22.67–79.41)	38.9	61.81 (19.87–134.64)	75.4	45.17 (24.70–83.72)	50.7	42.25 (14.62–85.51)	45.0
40	30.88 (17.03–60.83)	13.8	46.46 (14.27–99.48)	52.0	44.35 (24.06–84.90)	48.3	40.19 (13.55–87.60)	40.3
50	25.36 (13.49–47.05)	3.5	38.23 (12.63–78.10)	33.2	44.78 (23.92–86.83)	49.1	40.22 (13.83–82.89)	40.0
60	41.29 (22.13–81.13)	41.0	62.15 (20.39–133.25)	77.2	45.43 (24.41–87.61)	51.6	41.92 (14.37–91.07)	43.0
70	35.67 (18.19–71.31)	22.3	54.41 (16.90–117.60)	65.5	45.35 (23.18–85.84)	50.7	42.52 (13.85–91.53)	44.4
80	32.70 (17.22–61.83)	14.4	48.36 (15.19–105.25)	56.7	45.79 (25.42–82.89)	51.8	42.20 (13.45–83.20)	44.4
90	28.14 (15.47–53.09)	7.3	42.92 (13.50–89.43)	45.0	44.62 (24.15–85.52)	49.1	40.92 (13.77–86.92)	42.1
100	26.55 (13.81–51.58)	3.9	38.13 (9.43–79.44)	35.1	44.62 (24.46–85.50)	49.1	41.79 (14.33–86.84)	43.7

^a Mean predicted AUC values, expressed as $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$, are from different simulated dosing strategies in patients showing estimated CL_{CR} values from 10 to 100 ml/min and body weight of 66.2 kg (mean population value). See Table 1 for dosing adjustments.

^b CL_{pop} and F_{pop} values were estimated from the final model.

order absorption process and elimination from the central compartment. This corresponds with previous studies of i.v. ganciclovir (29) and oral valganciclovir in SOT patients (26). The population pharmacokinetics model obtained in this work yielded basic pharmacokinetic parameter estimates that were in agreement with previous results (29).

In the current study, CL of ganciclovir was influenced by renal function through the estimated CL_{CR} according to the Cockcroft-Gault formula (5), a result that is expected with a drug that is excreted unchanged by the kidney (20) and which has been reported previously (29). Explicitly, the CL of ganciclovir was estimated to increase with estimated CL_{CR} . This supports a CL_{CR} -tiered dosing regimen for ganciclovir/valganciclovir to ensure similar exposure across the renal function range in transplant patients.

CL_{CR} was shown to be the most influential covariate; the estimated CL_{CR} explained most of the interpatient variability in CL (52.03%). Other covariates tested, statistically justifiable for the model, including gender or coadministration of tacrolimus, were correlated with CL_{CR} . Of note, gender influence may be confounded because 6 of 10 females were kidney transplant recipients having CL_{CR} values of <38 ml/min, whereas only 4 of 10 males were kidney transplant recipients and three of the four had CL_{CR} values of >58 ml/min. Similarly, the influence of tacrolimus coadministration could be attributed to the fact that six out of eight patients (75.0%) taking tacrolimus were kidney transplant recipients and three of these five were treated with tacrolimus because of an acute rejection episode, so they had compromised renal function, evidenced by their estimated CL_{CR} values (lower than 35 ml/min). The results of the present study indicated that no pharmacokinetic parameters were statistically related to body weight. The influence of body weight on CL was not statistically significant and explained only 4% of interpatient variability in CL. Therefore, in transplant patients, variability due to renal function appeared to be more relevant than that due to differences in body weight.

In fact, the therapeutic impact of this may be irrelevant since estimation of CL_{CR} is adjusted by body weight, and hence, this factor is implicit in dose adjustment using CL_{CR} calculations.

In the present study, the fact that body weight did not statistically influence CL was inconsistent with the results of a previous population pharmacokinetics study (29) in which i.v. ganciclovir (1.2 to 5.0 mg/kg) was given to HIV-positive patients and kidney transplant patients and which demonstrated that even when CL was corrected by body weight, CL_{CR} and disease process, the interpatient variability associated with ganciclovir CL was 47.5% (CV%). By comparison, the present study demonstrated an interpatient variability in ganciclovir CL of only 32.71% (CV%).

On the other hand, according to that study (29), the ganciclovir CL estimated for a 66.2-kg (mean body weight of the population of the present study) kidney transplant patient with a CL_{CR} value of 40 ml/min was shown to be 6.43 liter/h [estimated from $CL = 0.382 + 0.168 \cdot \text{body weight} \cdot (CL_{CR}/100) \cdot (1 - T) \cdot (1 - CMV)$, where $T = 0/0.76$ for nontransplant/transplant patients and $CMV = 0/0.41$ for HIV-positive patients shedding CMV into urine/HIV-positive patients with CMV retinitis], whereas a value of 5.26 liter/h [estimated from $CL = 7.49 \cdot (CL_{CR}/57)$] was given by the model developed in the present study. These discrepancies could be attributed to the fact that only 5 of the 53 patients included in the previous study were kidney transplant patients, and hence, it is possible that CL values could not be accurately estimated in the kidney transplant subpopulation.

The results of the present study predicted that typical CL would range from 1.31 liter/h (for a typical patient with CL_{CR} of 10 ml/min) to 13.14 liter/h (for a typical patient with CL_{CR} of 100 ml/min) [both values were estimated from $CL = 7.49 \cdot (CL_{CR}/57)$]. The therapeutic implications of this are that patients with CL_{CR} values of 100 ml/min would require considerably larger doses (around 10 times) of ganciclovir than those with CL_{CR} values of 10 ml/min.

Regarding the other pharmacokinetic parameters estimated by the final model reported herein, the V_1 and V_2 values were consistent with those estimated from results previously reported by Yuen et al. (29) ($V_1 = 0.391 \cdot \text{body weight}$ and $V_2 = 0.511 \cdot \text{body weight}$; i.e., for a patient of 66.2 kg, V_1 was 31.90 liter herein versus 25.88 liter in the study of Yuen et al. and V_2 was 32.0 liter versus 33.83 liter, respectively), as was intercompartmental clearance (10.20 liter/h versus 13.4 liter/h, respectively).

Both Yuen et al. (29) after administration of i.v. ganciclovir and Wiltshire et al. (26) after administration of oral ganciclovir and oral valganciclovir to SOT patients reported that body weight was statistically significant in V_1 and V_2 ; however, no significant relationship between distribution volumes and body weight could be demonstrated in the present study.

The k_a and lag time parameters estimated in the current study differed from those reported by Wiltshire et al. (26) (0.895 versus 0.36 h⁻¹ for k_a and 0.382 h versus 0.661 h for lag time, respectively). These differences could be attributed to the sampling design used in each study. In the present study, the absorption process was characterized by sampling at 0.5, 1, 1.5, 2, and 3 h postadministration, while in the Wiltshire study (26), only one sample covered the absorption phase (1 to 3 h). The absolute F after oral administration of valganciclovir was 0.825 in the present study. To our knowledge, this is the first report of this parameter in an SOT population infected by CMV.

One of the purposes of this study was to use the model developed to evaluate the adequacy of the manufacturer's recommended CL_{CR} -adjusted doses to prevent under- or overexposure to ganciclovir. On the basis of previous work (27), viremia can be suppressed during prophylaxis with exposures of 40 to 50 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$; hence, in the current study, a target exposure of 45 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ was considered adequate for that purpose.

Comparison of exposures achieved after the manufacturer's recommended initial doses, taking into account a body weight of 66.2 kg (mean population value in this study), to those after dose adjustment by $\text{AUC}_{\text{target}}$ using the model developed (Table 4) showed that orally administered doses resulted in adequate exposures in all cases, with the exception of patients with CL_{CR} values under 30 ml/min, in which case overexposure occurred. Actually, mean AUC values of 94.46 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ ($\text{CL}_{\text{CR}} = 20$ ml/min) and 190.35 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ ($\text{CL}_{\text{CR}} = 10$ ml/min) were found with the 92.4% and 98.8%, respectively, of patients showing exposure values higher than 45 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$. After i.v. administration, a tendency to underexposure for patients with CL_{CR} values over 80 ml/min (mean AUC values were 28.14 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ for patients with a CL_{CR} of 90 ml/min and 26.55 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ for those with a CL_{CR} of 100 ml/min) and overexposure for patients with CL_{CR} values under 30 ml/min was observed (mean AUC values were 62.12 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ for patients with a CL_{CR} of 20 ml/min and 128.74 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ for those with a CL_{CR} of 10 ml/min). Patients with CL_{CR} values of 50 ml/min were specifically underdosed after i.v. administration (mean AUC values were 25.36 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$, and only 3.5% of patients achieved an exposure higher than 45 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$). These results are also graphically displayed in Fig. 4 and are in agreement with the percentages of patients achieving exposure values over 45 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ for each CL_{CR} cutoff value (Table 4).

Dose adjustment by the model developed in this study pro-

vided mean AUC values closer to the target of 45 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ in all cases. Moreover, the percentages of patients achieving exposures higher than 45 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ ranged from 40 to 50%, which is more in line with the percentages that should be expected.

The results presented here also indicate that our model could provide initial dose optimization based on CL_{CR} values and the target exposure (AUC) required to achieve efficacy, as well as further therapeutic drug monitoring, specifically for those patients in whom changes in renal function can occur throughout the treatment period.

In conclusion, adaptive dosing following the start of the treatment was feasible in the population studied, since they received repeated doses of ganciclovir/valganciclovir. An approach allowing modification of the ganciclovir/valganciclovir dose to achieve a target plasma exposure from the start of the treatment is likely to improve outcome in SOT patients infected by CMV. Studies with a larger number of patients would be necessary to confirm the optimum dosage regimen after both i.v. and oral administration. Hence, the results from this study might assist the optimization of initial dosing regimens aimed at achieving $\text{AUC}_{\text{target}}$ from the start of the treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Biochemistry Department (Hospital Vall d'Hebron) for their help in determining ganciclovir serum concentrations and the nurses of the Nephrology Department of Hospital de Bellvitge, Barcelona, for their technical support in ganciclovir/valganciclovir administration and blood sampling. We also thank Anne-Marie Stephani of Wolters Kluwer Health for editorial assistance with the preparation of the manuscript.

Support for this study was partly provided by Instituto Carlos III (Spain), plan 2005–2008.

The authors have no financial or personal conflicts of interest related to the manuscript.

The registration number at clinicaltrials.gov is NCT00730769.

REFERENCES

- Asberg, A., A. Humar, H. Rollag, A. G. Jardine, H. Mouas, M. D. Pescovitz, D. Sgarabotto, M. Tuncer, I. L. Noronha, and A. Hartmann. 2007. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 7:2106–2113.
- Avery, R. K. 2007. Valganciclovir versus IV ganciclovir for therapy of cytomegalovirus viremia: has victory been achieved? *Am. J. Transplant.* 7:2062–2063.
- Beal, S. L., and L. B. Sheiner (ed.). 1992. NONMEM VI user's guide. Globomax LLC, Hanover, MD.
- Brown, F., L. Banken, K. Saywell, and I. Arum. 1999. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers. *Clin. Pharmacokinet.* 37:167–176.
- Cockcroft, D. W., and M. H. Gault. 1976. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31–41.
- Crumpacker, C. S. 1996. Ganciclovir. *N. Engl. J. Med.* 335:721–729.
- Cvetkovic, R. S., and K. Wellington. 2005. Valganciclovir: a review of its use in the management of CMV infection and disease in immunocompromised patients. *Drugs* 65:859–878.
- Czock, D., C. Scholle, F. M. Rasche, D. Schaarschmidt, and F. Keller. 2002. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir in renal impairment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72:142–150.
- Dubois, D., and E. Dubois. 1916. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight are known. *Arch. Intern. Med.* 17:863–871.
- Efron, B. 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann. Stat.* 7:1–26.
- Einsele, H., P. Reusser, M. Bornhauser, P. Kalhs, G. Ehninger, H. Hebart, Y. Chalandon, N. Kroger, B. Hertenstein, and F. Rohde. 2006. Oral valganciclovir leads to higher exposure to ganciclovir than intravenous ganciclovir in patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 107:3002–3008.

12. **Ette, E. I., and T. M. Ludden.** 1995. Population pharmacokinetic modeling: the importance of informative graphics. *Pharm. Res.* **12**:1845–1855.
13. **Jonsson, E. N., and M. O. Karlsson.** 1999. Xpose: an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput. Methods Programs Biomed.* **58**:51–64.
14. **Karlsson, M. O., E. N. Jonsson, C. G. Wiltse, and J. R. Wade.** 1998. Assumption testing in population pharmacokinetic models: illustrated with an analysis of moxonidine data from congestive heart failure patients. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **26**:207–246.
15. **Karlsson, M. O., and R. M. Savic.** 2007. Diagnosing and model diagnostics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **82**:17–20.
16. **Karlsson, M. O., and L. B. Sheiner.** 1993. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **21**:735–750.
17. **Kerbusch, T., P. A. Milligan, and M. O. Karlsson.** 2004. Assessment of the relative in vivo potency of the hydroxylated metabolite of darifenacin in its ability to decrease salivary flow using pooled population pharmacokinetic-pharmacodynamic data. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **57**:170–180.
18. **Limaye, A. P.** 2002. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **35**:866–872.
19. **Lindbom, L., P. Pihlgren, and N. Jonsson.** 2005. PsN-Toolkit: a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput. Methods Programs Biomed.* **79**:241–257.
20. **McGavin, J. K., and K. L. Goa.** 2001. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* **61**:1153–1183.
21. **Pescovitz, M. D., J. Rabkin, R. M. Merion, C. V. Paya, J. Pirsch, R. B. Freeman, J. O'Grady, C. Robinson, Z. To, K. Wren, L. Banken, W. Buhles, and F. Brown.** 2000. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2811–2815.
22. **Pou, L., F. Campos, B. Almirante, et al.** 1993. A rapid liquid chromatographic (HPLC) method for determination of ganciclovir in serum, p. 183–186. *In* M. M. Galteau, G. Siest, and J. Henny (ed.), *Biology prospective. Comptes rendis du 8ieme Colloque de Pont-a-Mousson.* John Libbey Eurotext, Paris, France.
23. **Savic, R. M., D. M. Jonker, T. Kerbusch, and M. O. Karlsson.** 2007. Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **34**:711–726.
24. **Tolkoff-Rubin, N. E., and R. H. Rubin.** 1999. The impact of cytomegalovirus infection on graft function and patient outcome. *Graft* **2**:S101–S103.
25. **Vancíková, Z., and P. Dvorak.** 2001. Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals: a review. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **1**:179–187.
26. **Wiltshire, H., S. Hirankarn, C. Farrell, C. Paya, M. D. Pescovitz, A. Humar, E. Dominguez, K. Washburn, E. Blumberg, B. Alexander, R. Freeman, and N. Heaton.** 2005. Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir, in solid organ transplant recipients. *Clin. Pharmacokinet.* **44**:495–507.
27. **Wiltshire, H., C. V. Paya, M. D. Pescovitz, A. Humar, E. Dominguez, K. Washburn, E. Blumberg, B. Alexander, R. Freeman, N. Heaton, and K. P. Zuideveld.** 2005. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation* **79**:1477–1483.
28. **Winston, D. J., L. R. Baden, D. A. Gabriel, C. Emmanouilides, L. M. Shaw, W. R. Lange, and V. Ratanatharathorn.** 2006. Pharmacokinetics of ganciclovir after oral valganciclovir versus intravenous ganciclovir in allogeneic stem cell transplant patients with graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12**:635–640.
29. **Yuen, G. J., G. L. Drusano, C. Fletcher, E. Capparelli, J. D. Connor, J. P. Lalezari, L. Drew, S. Follansbee, D. Busch, M. Jacobson, et al.** 1995. Population differences in ganciclovir clearance as determined by nonlinear mixed-effects modelling. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2350–2352.

5. DISCUSIÓN

El trabajo que forma parte de la presente Tesis engloba dos aspectos cruciales en el diseño de regímenes de dosificación, la eficacia y seguridad del fármaco, y la exposición al mismo. Efectivamente, se ha estudiado la eficacia y seguridad tras una estrategia de tratamiento corto, de la infección/enfermedad por citomegalovirus humano, con ganciclovir administrado por vía IV seguido de valganciclovir administrado por vía oral, en pacientes trasplantados de órgano sólido. Asimismo, el hecho de disponer de concentraciones séricas de ganciclovir tras la administración de ambos fármacos (ganciclovir/valganciclovir) ha permitido estudiar y comparar la exposiciones al fármaco alcanzadas, y su relación con la eficacia/seguridad al tratamiento. La identificación de los factores predictivos de la variabilidad farmacocinética del ganciclovir, ampliamente reportada en la literatura[114,183] y en parte responsable de las distintas respuestas al tratamiento observadas en pacientes trasplantados de órgano sólido infectados por hCMV, también ha sido uno de los objetivos de dicha Tesis. Todo ello se ha vehiculizado mediante el desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional a partir de las concentraciones séricas disponibles de ganciclovir. Por otra parte, aunque se han investigado desde un punto de vista descriptivo los factores potencialmente predictivos de la variabilidad farmacodinámica, y por tanto también responsables de variabilidad en la respuesta, el desarrollo de un modelo farmacocinético-farmacodinámico poblacional que permita individualizar las dosis de ganciclovir/valganciclovir en base a una eficacia óptima y mínimos efectos adversos, no ha formado parte del ámbito de la presente Tesis. Como consecuencia, el modelo farmacocinético poblacional desarrollado puede por una parte ser aplicable para la individualización de la dosis en base a la exposición diana a ganciclovir reportada en estudios previos[126], durante la monitorización terapéutica, pero también constituir la etapa previa en el desarrollo de un modelo farmacocinético-farmacodinámico poblacional mecanístico que permita definir la exposición diana en la población de estudio así como realizar ajuste de dosis en base a ésta.

Puesto que los resultados de esta Tesis se han descrito ampliamente en cada uno de los capítulos correspondientes, en este capítulo solo se discutirán de forma global los aspectos más relevantes, destacando las consideraciones acerca de las futuras líneas de actuación en la optimización de la terapia con ganciclovir/valganciclovir. También se discutirán de forma más amplia y detallada aspectos que no pudieron ser incluidos en las publicaciones en su momento.

Capítulo 1

Estudio de eficacia y seguridad

De acuerdo con los antecedentes ya expuestos en la memoria, el ganciclovir administrado por vía endovenosa fue aprobado para el tratamiento de la infección y enfermedad por hCMV en trasplante de órgano sólido[133], así como para la prevención[184]. No obstante esta vía de administración y los correspondientes inconvenientes asociados, tales como necesidad de hospitalización de los pacientes, riesgo de nuevas infecciones asociadas con la vía de administración utilizada y costes elevados, no permitían tratamientos muy prolongados. Dada su baja biodisponibilidad oral el ganciclovir requería ser administrado 3 veces al día por lo que dicha vía de administración solo era factible para el tratamiento profiláctico. El surgimiento del valganciclovir profármaco del ganciclovir (valil ester) de administración oral, permitió la administración por vía oral asegurando una mayor comodidad para el paciente y una biodisponibilidad adecuada (60%).

Los estudios más relevantes de eficacia y seguridad de valganciclovir en pacientes trasplantados renales previos a la publicación del primer trabajo de esta Tesis (capítulo 1), fueron en su mayoría estudios de profilaxis para la prevención de la infección o enfermedad por citomegalovirus humano[73,126,185], primera indicación para la cual había sido aprobado el producto en trasplante de órgano sólido. En todos los casos se incluyó un número elevado de pacientes (N=364 a 372), y la duración del tratamiento fue prolongada (aproximadamente 3 meses). Una de las hipótesis planteadas antes de llevar a cabo el presente estudio fue la escasa existencia, en aquel momento, de estudios publicados acerca de estrategias de tratamiento de la infección/enfermedad por hCMV similares a la estudiada tanto en cuanto a duración del tratamiento de inducción como de mantenimiento.

Efectivamente, tal como se resume en la tabla 9, aunque existían estudios de eficacia y seguridad del valganciclovir en el tratamiento de la infección y enfermedad por hCMV realizados en el mismo periodo, pero publicados con anterioridad al nuestro (2004-2005 vs 2010), estos fueron en su mayoría de mayor duración y al igual que en el presente, el número de pacientes incluidos fue escaso en todos ellos (N=14-32). Efectivamente, en nuestro caso se incluyeron 21 pacientes y la estrategia secuencial de corta duración consistió en un tratamiento de inducción con ganciclovir IV (5 mg/kg cada 12 horas) durante 5 días, seguido de valganciclovir oral (900 mg cada 12 horas) hasta completar los 21 días de terapia. Dados los costes de hospitalización asociados al tratamiento endovenoso y la incomodidad que ello supone para el paciente, un tratamiento endovenoso de únicamente 5 días podría reducir los costes y mejorar la calidad de vida del paciente. Dicha estrategia permitió además comparar la exposición a valganciclovir con respecto a ganciclovir en los mismos pacientes. El seguimiento de los pacientes se prolongó hasta seis meses, período similar al de alguno de los estudios previos[186][187]. Con posterioridad al inicio de nuestro estudio se planteó el estudio VICTOR cuyos resultados fueron publicados por Asberg y col[141](2007) antes del presente estudio de eficacia[142]. A diferencia del nuestro, en el estudio VICTOR se incluyó un número bastante superior de pacientes (N=321) con dos brazos de tratamiento de forma que en un brazo (N=157) la inducción se hizo con 5 mg/kg de ganciclovir IV cada 12 horas durante 21 días y en el otro (N=164) con 900 mg de valganciclovir oral cada 12 horas también durante 21 días; el tratamiento de mantenimiento fue de 900 mg/día de valganciclovir durante un total de 28 días en ambos brazos. La duración total de este estudio fue de 49 días vs los 21 días del nuestro y en este caso no se compararon exposiciones de VGC vs GCV. El período de seguimiento fue también de 12 meses.

En el capítulo 1 de resultados se describen los resultados de eficacia, seguridad y exposición comparativa (VGC vs GCV) del trabajo de la presente Tesis. Entre los resultados más relevantes destacan en primer lugar la erradicación del virus en un 66.7% de los pacientes al final del tratamiento de 21 días. Este porcentaje es similar al obtenido a los 49 días después del tratamiento de

inducción/mantenimiento con VGC/VGC y GCV/VGC en el estudio VICTOR (67.1% y 70.1%, respectivamente)[141]. Ambos resultados fueron superiores al del estudio de Humar y col[188], (50%), pero inferiores al del estudio de Babel y col [186] (100% erradicación). La característica diferencial del estudio de Babel y col[186] se basa en que se prolongó el tratamiento (900 mg/12 horas) hasta conseguir dos antigenemias negativas y además se añadieron dos semanas más de mantenimiento (900 mg/día), como consecuencia los pacientes recibieron un tratamiento más largo.

El porcentaje de pacientes que no erradicaron el virus el día 21 al finalizar el tratamiento, en nuestro estudio, fue del 33%, este valor algo inferior al valor observado por Asberg y col. (54.9% y 51.6% tras VGC/VGC y GCV/VGC, respectivamente) corresponde a un número de pacientes bastante inferior al del estudio VICTOR, pero en cualquier caso sugirió que 21 días de tratamiento eran insuficientes para la erradicación del virus, particularmente en pacientes con carga viral basal alta (>100000 copias DNA/mL). Efectivamente, en nuestro estudio se observó una tendencia a mayor persistencia de la carga viral el día 21 al finalizar el tratamiento en los pacientes de carga viral basal alta (>100000 copias DNA/mL, n=9) con respecto al grupo de carga viral basal baja (<100000 copias DNA/mL, n=12), sugiriendo una cinética de erradicación basal- dependiente de acuerdo con los hallazgos de Asberg y col[143]. Estos autores sugirieron también la carga basal como factor predictivo de la ausencia de erradicación del virus, no habiéndose demostrado relación entre los porcentajes de erradicación viral y los serotipos. En nuestro estudio la contribución de pacientes de alto riesgo (D+/R-) que erradicaron el virus el día 21 fue de un 21.4% mientras que en el grupo que no erradicaron, los pacientes D+/R- representaron un 42.9%. En cuanto a los pacientes tratados con globulinas anti-timocíticas (ATG), considerado también este un factor de riesgo [53], 3 de 6 presentaron carga viral basal elevada y los restantes baja, además 2 de 3 pacientes que erradicaron el virus el día 21 eran del grupo de carga basal baja y 2 de los 3 que no lo hicieron presentaron carga basal alta. Por tanto si que se observó una tendencia hacia un mayor porcentaje de D+/R- dentro del grupo que no erradicaron vs los que si lo hicieron. En cualquier caso, también se vio que la mayoría, aunque no todos los pacientes D+/R-

presentaban cargas virales basales elevadas (4 de 6). Ello podría estar relacionado con la respuesta inmunológica del receptor. Aunque se haya llevado a cabo una estrategia de tratamiento anticipado, se desconoce el tiempo exacto de inicio de la infección, por lo que es probable que en el momento de la detección de la misma por antigenemia, la replicación viral llevara ya en curso un determinado período de tiempo. La inmunidad celular debida a la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ parece ser la responsable del control de la replicación del hCMV [53,190,191], como consecuencia la cinética de replicación del hCMV podría depender en parte de dicha actividad citotóxica anti-hCMV, siendo más probable que en receptores hCMV negativos esta replicación no pudiera ser controlada por el sistema inmune celular y se alcanzaran valores de carga viral más elevados con el consiguiente desarrollo de enfermedad citomegálica. En este sentido destacar, que el porcentaje de pacientes de alto riesgo (D+/R-) en el estudio VICTOR fue inferior, (16% vs 28.6%) y las cargas virales basales no alcanzaron las 100.000 copias de DNA/mL valor que superaban algunos pacientes de nuestro estudio (n=9). Sorprendentemente, aun siendo las cargas virales basales inferiores a las de nuestro estudio entre un 51.5% y un 54.9% de pacientes no erradicaron el virus el día 21. La diferencia observada en los valores de carga basal entre ambos estudios podría atribuirse al método de detección del virus de Asberg y col[141]. Concretamente PCR a tiempo real vs a la determinación de la antigenemia pp65 utilizada en nuestro trabajo, durante el seguimiento del tratamiento de la enfermedad por hCMV. El mayor porcentaje de ausencia de erradicación viral el día 21 en el estudio VICTOR (51.5-54.9%) frente al nuestro (33%) confirmaría que probablemente la respuesta antiviral sea el resultado de una compleja interacción entre el virus y el huésped. Asimismo, en nuestro estudio, se observó una tendencia a un mayor porcentaje de erradicación el día 21 en pacientes con carga viral basal baja entre los tratados con ATG (2/3) que entre los de carga viral basal alta que recibieron este tratamiento (1/3).

En cualquier caso, destacar que además de la duración y estrategia del tratamiento (período inducción/mantenimiento) existen otros factores a considerar en los distintos estudios publicados y pueden por tanto contribuir a las posibles diferencias observadas entre los resultados obtenidos, destacando i) tipo de

técnica diagnóstica (antigenemia vs PCR) y técnica de detección del CMV (límite de detección considerado) ii) día de inicio del tratamiento respecto al día del trasplante, iii) porcentaje de pacientes de alto riesgo (D+/R-) iv) tratamiento inmunosupresor asociado v) carga viral basal al inicio del tratamiento y vi) respuesta inmunológica del paciente frente al hCMV, vii) posibles mutaciones del hCMV.

Respecto a la cinética de erradicación del virus, los resultados obtenidos demostraron que en el grupo de carga basal baja la erradicación se consiguió entre los 5 y 90 días (mediana, 15 días), mientras que en los de carga viral basal alta lo hizo entre los 10 y 180 días (mediana 15 días). Los valores extremos correspondieron a pacientes con recidivas.

Tal como se muestra en el capítulo 1, las curvas de reducción de la carga viral en función del tiempo mostraron un perfil exponencial de acuerdo con publicaciones previas [188] y con pendientes paralelas en ambos grupos (carga viral basal alta vs baja), sugiriendo cinéticas de caída similares. La cinética de eliminación del virus podría estar influida tanto por el tratamiento inmunosupresor concomitante como por la respuesta inmunitaria del paciente. Aunque existía información acerca del primer aspecto el tratamiento inmunosupresor fue similar para todos los pacientes, siendo por tanto difícil extraer conclusiones en este sentido. Por otra parte el tamaño muestral del estudio, tratándose de un estudio piloto, fue otra de las limitaciones.

El segundo resultado importante del estudio, además de los porcentajes de erradicación al final del tratamiento, fue el porcentaje de recidivas observado durante el período de seguimiento. 3 pacientes de 21 pacientes (14.3%) presentaron recidivas sintomáticas con un total de 4 episodios (19%). Únicamente 1 de los 3 pacientes con recidiva había erradicado el virus el día 21 mientras que los otros 2 no lo habían hecho. Todos ellos pertenecían al grupo de serotipo hCMVD+/R- y las cargas virales basales fueron tanto alta (N=1) como baja (N=2). Ninguno de ellos desarrolló resistencia al fármaco. Dichas recidivas se presentaron hacia los tres meses desde el inicio del tratamiento (mediana= 59 días, min-max: 47-61 días). Estos resultados sugerían una tendencia a mayor riesgo a presentar

recidiva, por parte de los pacientes que no erradicaban al finalizar el tratamiento que de los que si lo hacían. Sin embargo el escaso número de pacientes incluidos en el estudio no permitió extraer conclusiones aunque dicha tendencia está de acuerdo con Asberg y col[143] que afirmaron que la ausencia de erradicación del virus el día 21 del tratamiento de inducción supuso un aumento de cuatro veces del riesgo de recidiva. Todo ello apoya la estrategia de Babel y col[186] consistente en prolongar el tratamiento hasta conseguir erradicación viral para evitar el riesgo de recidiva. Por otra parte dichos autores observaron porcentajes de recidiva sintomática (15%) próximos a los del presente estudio, aunque las recidivas virológicas, no evaluadas en nuestro estudio, fueron del 30%.

En este sentido destacar la ausencia de información acerca de la respuesta inmunológica del paciente como las técnicas del QUANTIFERON y ELISPOT IFN- γ , que quizás hubiera contribuido a una mejor interpretación de los resultados, siendo esta una de las limitaciones del estudio.

El tercer resultado importante del trabajo fueron los efectos adversos observados que incluyeron anemia (38%), leucopenia (19%), neutropenia (9.5%), transaminitis (4.8%) y pancitopenia (4.8%). Todos los efectos adversos se resolvieron sin necesidad de abandonar el tratamiento excepto en uno de los pacientes que tuvo que discontinuar el tratamiento antiviral por pancitopenia (4,8%). La incidencia de discontinuaciones en el VICTOR fue de 6,7 y 4,5% en los grupos de valganciclovir oral y ganciclovir IV, respectivamente. En el estudio VICTOR [141] los efectos adversos ocurrieron con menor incidencia que en el presente estudio, posiblemente por criterios diferentes de corte para la valoración de los efectos adversos.

Por otra parte en el presente estudio, se observaron episodios de rechazo agudo en 4 de 21 pacientes (19%) durante el seguimiento, no durante la fase de tratamiento. En el estudio VICTOR se reportaron 25 episodios de rechazo agudo en 22 pacientes (7,8%) durante el periodo de tratamiento, no existiendo diferencias en la incidencia de rechazo agudo entre ambos grupos de tratamiento[141].

Estudio de la exposición a ganciclovir

El hecho de disponer de valores de concentración sérica en función del tiempo tanto el día 5 tras la administración de GCV IV, como el día 15 tras la administración de VGC oral, con un diseño intensivo de 11 muestras por curva y paciente, permitió estimar las exposiciones alcanzadas de ambos a través del cálculo del área bajo la curva de concentraciones séricas de fármaco vs tiempo, utilizando la aproximación no compartimental. A diferencia de estudios previos [187], el diseño de nuestro estudio permitió estimar y comparar los valores de AUC de ganciclovir tras la administración de GCV vs VGC dentro del mismo paciente, evitando el sesgo de la variabilidad interindividual en dicha estimación. Aunque los valores de AUC para el VGC (55.0 ± 19.5 ($\mu\text{g/mL}$) $\cdot\text{h}$) tendieron a ser ligeramente superiores a los de GCV (48.7 ± 23.8 ($\mu\text{g/mL}$) $\cdot\text{h}$), la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($p=0.054$). Dado el comportamiento cinético lineal del ganciclovir ampliamente descrito en la literatura[114] no era de esperar que los valores superiores de AUC de VGC frente a los de AUC de GCV fueran debidos a acumulación del fármaco. Los valores de exposición observados después de la administración de valganciclovir fueron superiores a los aportados por Wiltshire y col en pacientes trasplantados de órgano sólido, que habían recibido el tratamiento profiláctico de 900 mg/día (46.3 ± 15.2 ($\mu\text{g/mL}$) $\cdot\text{h}$). Por otra parte este estudio permitió también estimar una biodisponibilidad absoluta para el valganciclovir del 68%, valor concordante con los valores previos publicados [105,112,115].

Los resultados de este estudio sugirieron que la estrategia corta de 21 días de tratamiento propuesta puede ser una buena alternativa para el tratamiento de la infección por hCMV en la mayor parte de pacientes trasplantados de órgano sólido, a excepción de pacientes de alto riesgo (D+/R-) o pacientes receptores seronegativos tratados con globulinas anti-timocíticas, en que la replicación viral no esté controlada por la respuesta inmune, resultando en cargas virales basales altas en el momento de detección de la infección o bien en presencia de cepas resistentes.

En los demás casos, valores de exposición media al fármaco (AUC) del orden de 48.7 a 55.0 ($\mu\text{g/mL}$) $\cdot\text{h}$, pueden resultar en un tratamiento eficaz y seguro, aunque

sería conveniente la individualización de la dosis para evitar sobreexposiciones en algunos pacientes y efectos adversos. Los valores comparables de AUC de VGC con respecto a GCV sugieren la posibilidad de utilizar el profármaco por vía oral en lugar de la administración IV, contribuyendo así a la reducción de costes de hospitalización e incrementando la calidad de vida del paciente.

Dadas las limitaciones del estudio de eficacia para poder dar respuesta a la aparición de recidivas por una parte y a la ligera sobreexposición al fármaco en algunos pacientes del estudio, la etapa siguiente del presente proyecto fue plantear el desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional a partir de los datos experimentales de concentraciones séricas de fármaco en función del tiempo y las características demográficas bioquímicas y clínicas registradas de los pacientes en el estudio piloto. Dicho modelo permitiría por una parte individualizar el régimen de dosificación en cada paciente en base a una exposición diana relacionada con eficacia y mínimos efectos adversos. Por otra parte, dicho modelo constituiría la etapa previa al desarrollo de un modelo farmacocinético-farmacodinámico poblacional que permitiera individualizar el régimen de dosificación para cada paciente en base a la respuesta o reducción de la carga viral.

Tabla 1: Estudios de tratamiento de la infección/ enfermedad por hCMV publicados.

Estudio	Dosificación	Nº pac	Status enfermedad	Serotipo	Tiempo Seguim	Método eval eficacia	Efectos adversos	Recidivas	Resultados
Babel y col. 2004 [186]	Inducción: VGC 900 mg/12h hasta dos antigenemias negativas Mantenimiento: VGC 900 mg/d 2 semanas	21 Renal	Infección sintomática por hCMV	-	5 meses	Antigenemia Pp65	No	No	Durante el tratamiento la antigenemia se redujo de 5.2 ± 3.7 a 0.25 ± 0.2 células positivas/10000 PBMC
Fellay y col. 2005 [187]	Inducción: VGC900mg/12h 2-3 semanas. Mantenimiento: VGC900 mg/día de 2-4 semanas Dose adjusted to renal function.	14 SOT Renal=9 Corazón=2 Pulmón=3	Infección y enfermedad por hCMV	D+/R- 10 D+/R+ 3 D-/R+ 1	6 meses	Shell vial y PCR	Efectos adversos transitorios resueltos con reducción dosis: 1 aumento de transaminasas, 1trombocitopenia y 1 pancitopenia moderada	Viremia recurrence en 6/12 pacientes. En 2 curso adicionalVGC. Recidiva correlacinada con tto cortos (34.5 vs 53 d)	Los síntomas desaparecieron entre 4 y 18 días. Negativización a las 2 semanas en todos los pacientes
Humar y col. 2005 [188]	VGC 900 mg/12h mínimo 2 semanas y prolongar a criterio investigador. Media= $20.5 \pm 10d$	32 SOT Renal=13 Higado=7 Pulmón=9 Corazón=2	Infección(9) y enfermedad por hCMV (23)	D+/R- 15 D+/R+ 14 D-/R+ 3	4 semanas	Antigenemia pp65 y PCR	Neutropenia significativa en 2 pacientes, neutropenia leve en un paciente	Recurrencia virológica en 11 de 32 pacientes (34.4%) Recurrencia sintomática en 4 de 32 pacientes (12.5%)	Erradicación del virus día 21: 50% PCR 81.3% Ag Reducción carga viral día 7: $0.73 \log_{10}$ Día 14: $1.21 \log_{10}$ 2 Pacientes se cambiaron a GCv por poca respuesta a VGC
Singh y col. 2005 [189]	VGC900 mg/12h durante mínimo 2 semanas y hasta negativización Ag.	17 Higado	Terapia anticipada "preemptive"	D+/R- 11 D+/R+ 4 D-/R+ 1 D-/R- 1	4 semanas	Antigenemia pp65		"Recurrent shedding" 47.1% (8/17) que se correlacionó con pacientes D+/R- y la	Reducción Ag: Setm 1: 80.5% Setm 2:99.5% Setm 4: 97.7%

DISCUSIÓN

Estudio	Dosificación	Nº pac	Status enfermedad	Serotipo	Tiempo Seguimien	Método eval eficacia	Efectos adversos	carga basal de CMV Recidivas	Resultados
Diaz-Pedroche Y cols 2005 [192]	VGC 900 mg/12h durante mínimo 2 semanas y hasta negativización Ag. Media= 18(14-28) días	12 SOT Renal=4 Higado=4 Corazón=4	Terapia anticipada "preemptive" Ag≥25	-	6 meses	Antigenemia pp65	No significativos	1/12 pac presentó recidiva asintomática requirió un segundo ciclo de VGC.	Reducción Ag: Setm2: 66,6% Setm 4: 100%
Asberg y col. 2007 [141]	VGC 900 mg/12h durante 21 días, seguido de VGV 900 mg/día 28 días (N=164) VS GCV IV 5mg/kg/12h durante 21 días, seguido de VGV 900 mg/día 28 días (N=157)	321 SOT	Enfermedad por CMV	D+/R- 54 D+/R+ 134 D-/R+ 22 D-/R- 17 UNK 94	12 meses	-	Se interrumpió el tratamiento por efectos adversos en 11(6.7%) y 7(4,5%) de los pacientes de VGC y GCV, respectivamente.	-	Erradicación de la viremia: día 21: 45.1% día 49:67.1% Éxito del tratamiento Día 21:77.4% Día 49:85.4% Factor predictivo de la erradicación :carga viral basal no el serotipo
(-)información no aportada en la publicación correspondiente									

Capítulo 2**Estudio farmacocinético poblacional**

En el capítulo 2 se describen de forma detallada los resultados correspondientes al modelo farmacocinético poblacional desarrollado. En el momento de publicación de nuestro trabajo existían ya dos estudios farmacocinéticos poblacionales publicados, uno de ellos desarrollado por Yuen y col.(1995)[194] para el ganciclovir administrado por vía endovenosa en pacientes trasplantados renales y en pacientes de SIDA infectados por hCMV (N=53). Withshire y col. (2005)[126] también desarrollaron un modelo a partir de datos de concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración de ganciclovir oral 1000 mg 3 veces al día o bien valganciclovir oral 900 mg/día en pacientes trasplantados de órgano sólido (N=240). Perrottet y col. (2010)[183] también desarrollaron un modelo a partir de datos provenientes de la administración oral de valganciclovir. Nuestro objetivo fue desarrollar un modelo farmacocinético poblacional a partir de los datos de la población de trasplantados de órgano sólido de nuestro propio hospital que pudiera ser utilizado para la individualización de la dosis durante la monitorización terapéutica. A diferencia de estudios previos se disponía de concentraciones de ganciclovir tras la administración de ganciclovir por vía endovenosa y también tras la administración de valganciclovir vía oral de 20 de los pacientes incluidos en el estudio piloto de seguridad y eficacia. Uno de los pacientes no fue incluido en este análisis farmacocinético poblacional debido a interrupción del tratamiento.

De acuerdo con lo descrito en el capítulo 2, el comportamiento farmacocinético del ganciclovir tras la administración de GCV/VGC fue descrito por un modelo abierto de dos compartimentos con cinética de absorción de orden uno en el que la inclusión de tiempo de latencia resultó ser estadísticamente significativo. Esta descripción coincidió con los resultados de Perrottet y col. (2009)[183] y Wiltshire y col. (2005)[126]. Sin embargo la modelización de la incorporación del fármaco al organismo a partir de los modelos clásicos con tiempo de latencia supone describir un cambio abrupto en la velocidad de incorporación desde cero que no se corresponde con la realidad desde un punto de vista fisiológico. Por este motivo se probó también el modelo de los compartimentos de tránsito propuesto por Savic y

col. (2007)[195], para intentar describir el retraso observado en la absorción para algunos pacientes de forma más fisiológica. En nuestro caso este modelo no mejoró la descripción de los datos experimentales.

Además de, constante de velocidad de absorción de orden uno y tiempo de latencia, el modelo se parametrizó en términos de aclaramientos y volúmenes de distribución igual que los de Wiltshire y col., Perrottet y col. En nuestro caso fue además posible estimar el valor de la biodisponibilidad. La cinética de eliminación del fármaco fue de orden uno igual que en los estudios previos (Yuen y col., Wiltshire y col., Perrottet y col.).

Entre todos los modelos, el presente fue el que admitió la inclusión de variabilidad interindividual en un mayor número de parámetros, concretamente esta fue incluida en todos los parámetros excepto en el volumen de distribución del compartimento periférico a diferencia de los modelos previos que solo lo hicieron en el volumen de distribución en compartimento central y en el aclaramiento plasmático y adicionalmente en la exposición sistémica relativa de ganciclovir y valganciclovir en el estudio de Wiltshire y col. Esto podría estar relacionado con el diseño de muestreo de cada uno de los estudios. Sin embargo a diferencia de Perrottet y col, nuestro estudio no admitió variabilidad interocasión en ninguno de los parámetros farmacocinéticos siendo ello una de las limitaciones del estudio. De forma similar ocurrió en el estudio de Wiltshire y col. Ello podría ser debido al escaso número de ocasiones ($n=2$) en que los pacientes fueron ensayados en ambos estudio frente al estudio de Perrottet y col.[196]. El diseño del presente trabajo fue intensivo en todos los pacientes al igual que el de Yuen y col. Sin embargo Wiltshire y Perrottet combinaron diseños de datos dispersos con diseños de muestreo intensivos pero solo en algunos pacientes. En este sentido destacar que solo en el presente estudio se estimó el valor de "shrinkage"[197], asociado tanto a los valores de los efectos aleatorios interindividuales (η) como a los efectos aleatorios residuales (ϵ). Los valores de "shrinkage" de nuestro estudio fueron en todos los casos inferiores al 20%, hecho que confirma la robustez de las predicciones individuales de los parámetros farmacocinéticos a partir del modelo desarrollado. Esta información es fundamental cuando el objetivo es disponer de

un modelo para individualizar la dosis durante la monitorización terapéutica. Los valores de "shrinkage" elevados pueden ser consecuencia de diseños de datos dispersos, hecho que no ocurre en nuestro estudio.

Tras la exploración e inclusión de covariables la función renal estimada mediante el valor del aclaramiento de creatinina, fue el factor predictivo más importante de la variabilidad interindividual observada en el aclaramiento de ganciclovir, siendo ello esperable para un fármaco que se elimina mayoritariamente inalterado por excreción vía renal. De nuevo estos resultados concordaron con los de Yuen y col., Wiltshire y col., Perrottet y col. El aclaramiento de creatinina se estimó en base a la concentración de creatinina sérica y características demográficas de los pacientes (edad, peso corporal y sexo), mediante la ecuación de Cockcroft-Gault. Existe controversia en cuanto al mejor método para estimar el aclaramiento de creatinina en pacientes trasplantados renales. Rodrigo y col. (2003) recomiendan la ecuación del MDRD (Levey, 1999) como método más preciso de la estimación de la función renal en pacientes trasplantados renales, mientras que Trevillyan y col. (2013) [193] proponen la ecuación de Cockcroft-Gault (1976). En todos los trabajos previos se utilizó Cockcroft-Gault excepto en el estudio de Perrottet y col que aplicaron la fórmula del MDRD. En este cálculo interviene además de la concentración de creatinina, la de urea y albúmina y también el sexo.

En nuestro estudio, ninguna otra covariable que desde un punto de vista fisiológico pudiera explicar parte de la variabilidad observada en los parámetros farmacocinéticos del ganciclovir (peso, sexo, coadministración de fármacos nefrotóxicos: tacrolimus) resultó ser ni estadísticamente ($p > 0.05$) ni clínicamente significativa (reducción de la variabilidad interindividual asociada al parámetro farmacocinético en el cual se probó $< 10\%$) cuando se incluyó de forma secuencial prospectiva en el modelo de regresión entre aclaramiento de ganciclovir y aclaramiento de creatinina. Una de las principales limitaciones del modelo desarrollado en el presente estudio fue la ausencia de efecto estadísticamente y clínicamente significativo del peso corporal sobre los parámetros farmacocinéticos de disposición del ganciclovir. Existe evidencia previa de la influencia del peso en los parámetros farmacocinéticos. Tradicionalmente, los parámetros farmacocinéticos se han escalado con el peso de forma lineal. De acuerdo con las

leyes de la alometría dicho escalado es válido en el caso de los volúmenes de distribución mientras que el aclaramiento, para fármacos de excreción renal, debería correlacionar con los factores antropométricos determinantes de la tasa de filtración glomerular de acuerdo con la relación dada en la ecuación 15, donde el exponente alométrico es igual a 0.75[198].

$$CL = CL_{std} \cdot (W/70)^{0.75} \quad \text{Ecuación 1}$$

(CL_{std} es igual al valor típico del aclaramiento en un paciente de 70 kg de peso corporal).

El escalado alométrico de los parámetros farmacocinéticos con el peso permite la aplicación del modelo para una población de pacientes de amplio rango de variación de peso contribuyendo a mejorar su dosificación.

En nuestro caso, la inclusión del peso, sin atender a consideraciones estadísticas, y de acuerdo con las leyes de la alometría empeoró la capacidad predictiva del mismo, evidenciada a través de las técnicas de validación interna utilizadas, por lo que se decidió eliminar esta covariable del mismo. Todo ello fue consecuencia del estrecho margen de variación en los valores de peso en los pacientes incluidos en el estudio (peso medio (error estándar relativo): 66.2 (12.9) kg). Por el contrario, en el estudio de Perrottet, los valores de peso corporal, que si resultó ser factor predictivo al menos del volumen de distribución en compartimento central, fueron de 46 a 115 kg. También en el estudio de Wiltshire y col, el peso (con rango de variación más amplio que en el presente estudio: peso medio (error estándar relativo): 79.6 (21.2) kg), fue predictor del aclaramiento del fármaco demostrándose una relación alométrica entre ambas variables (exponente=0.725).

Dado que en el cálculo del CLCR por Cockcroft-Gault interviene el peso corporal, se intentó desarrollar el modelo con los valores de CLCR estimados por MDRD, parámetro no ajustado por el peso, con el fin de poder hallar significación estadística al incluir el peso como covariable en el aclaramiento del ganciclovir, ya en el modelo farmacocinético, sin embargo siguió sin encontrarse significación estadística.

Como consecuencia solo el CLCR asociado al aclaramiento de ganciclovir pudo describir parte de la variabilidad interindividual observada en este parámetro que

se redujo aproximadamente en un 52%. La variabilidad interindividual del CL de ganciclovir en el modelo final (32.7%) fue ligeramente superior pero del orden de la observada en el modelo de Perrottet (26%) y en ambos casos superior a la observada en el modelo de Wiltshire y col.(18.2%). A diferencia del presente modelo, en el de Perrottet y col. se incluyeron además de la función renal, el tipo de trasplante y el sexo como factores predictivos del aclaramiento de ganciclovir y en el de Wiltshire el peso corporal y la co-administración de tacrolimus. Esto podría explicar una mayor parte de variabilidad interindividual asociada al aclaramiento obteniéndose por tanto valores inferiores de la misma en el modelo final. El mayor número de pacientes de los estudios de Perrottet y col (N=65) y Wiltshire y col (N=240) podría también explicar el hecho de que la variabilidad interindividual (VII) asociada al CL haya podido ser mejor descrita. En cualquier caso, la VII hallada en el presente estudio fue aceptable para poder aplicar el modelo en la individualización de la dosis durante la monitorización terapéutica. Los valores de los parámetros farmacocinéticos estimados fueron acordes con los de los estudios previos y se estimaron todos con precisión. Sus valores estuvieron dentro del intervalo de confianza del 95% estimado mediante el método Bootstrap. Los valores medios muestrales de los parámetros poblacionales estimados a partir de 200 muestras de 20 pacientes obtenidas de la población original mediante el método bootstrap presentaron desviaciones inferiores al 8.5% con respecto a los valores medios poblacionales estimados a partir de la población original. El valor del error residual del modelo fue del 37.8% (proporcional) y 0.465 µg/mL (aditivo) valores dentro de la normalidad y en concordancia con los de los estudios anteriores (Perrottet y col.: 21% proporcional; Witshire y col.:35.6% proporcional).

Uno de los objetivos perseguidos con el desarrollo del presente modelo fue su aplicabilidad en la práctica clínica para la individualización de la dosis por lo que fue muy importante demostrar su capacidad predictiva. Las técnicas de validación aplicadas en su momento fueron técnicas de validación interna dado que no se disponía de datos de otro grupo de pacientes externo al de la población de desarrollo para llevar a cabo una validación externa del modelo.

El método de validación interna utilizado en la publicación fue el método bootstrap que demostró la estabilidad del modelo. Otra de las técnicas utilizadas en aquel

momento era la evaluación visual predictiva que requería simular los perfiles de concentraciones séricas de ganciclovir de 1000 pacientes estratificados en función de distintos valores de las covariables que fueran predictivas en el modelo, el CLCR en nuestro caso. A partir de los valores de concentración simulados se calculaban los intervalos de confianza del 90% y se superponían con las observaciones experimentales que debían estar dentro de las bandas de predicción para poder confirmar la capacidad predictiva del modelo. Sin embargo el hecho de tener que estratificar era un inconveniente y además este método no evitaba considerar como correctos modelos que proporcionaban estimaciones sesgadas como se ha visto posteriormente. Dado que desde aquel momento se ha evolucionado mucho en lo que respecta a técnicas de validación interna, presentamos aquí la validación interna del modelo mediante la evaluación visual predictiva corregida por la predicción (Figura 9)[199]. Esta técnica permite validar sin necesidad de estratificar en función de las dosis administradas o de los valores de las covariables que hayan resultado ser predictivas en el modelo. Los resultados de la Figura 9 confirman la capacidad predictiva del modelo.

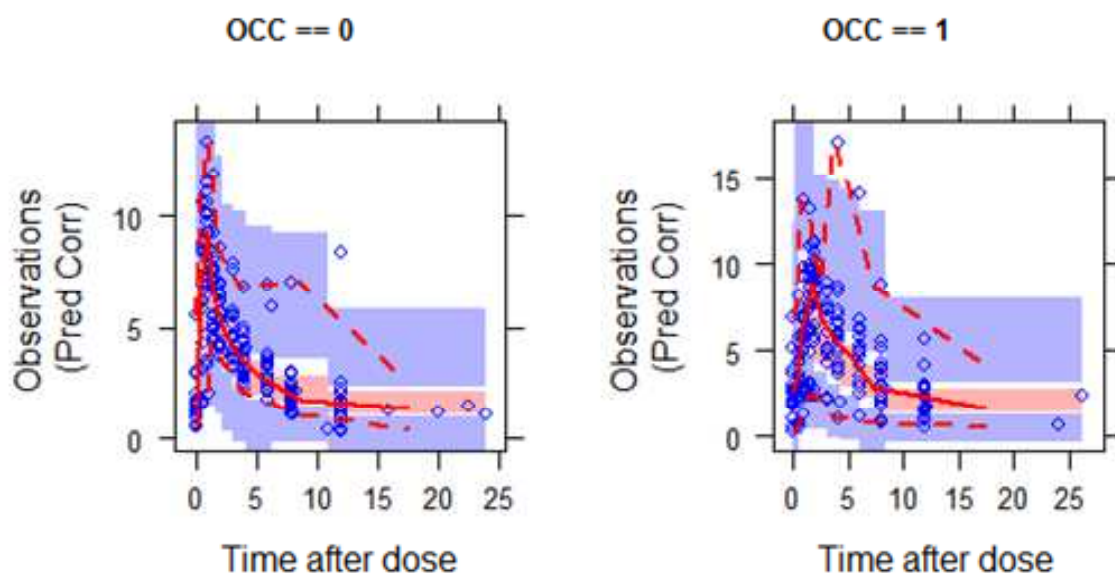


Figura 1. Evaluación visual predictiva corregida por la predicción correspondiente a los perfiles de concentraciones séricas de ganciclovir obtenidos tras la administración iv (panel izquierdo) y oral (panel derecho). En ambos casos los percentiles 5%, 50% y 95% de los datos observados de concentración vs tiempo caen dentro de los intervalos de predicción del 90% de los percentiles 5%, 50% y

95% de los datos simulados por el modelo, siendo ello indicativo de la capacidad predictiva del modelo. Únicamente tras la administración intravenosa se observa una ligera infrapredicción de los valores de los percentiles del 5%.

Una vez desarrollado, el modelo permitió comparar el régimen de dosificación utilizado hasta el momento según ficha técnica, con las dosis ajustadas por función renal, con el régimen de dosificación estimado a partir del modelo para conseguir una exposición diana dada por un valor de área bajo la curva de concentraciones séricas frente al tiempo de 45 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$). Este valor se basó en los resultados del estudio de Wiltshire et al[185]. Estos autores desarrollaron un modelo de regresión logística a partir del cual establecieron que podía erradicarse el virus durante la terapia profiláctica con exposiciones a ganciclovir de 40-50 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$) y por ello el valor de 45 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$) se consideró adecuado. Todo ello se hizo mediante la herramienta de la simulación de Monte Carlo [200]. Se calcularon los valores medios de exposición (AUC) simulados así como sus intervalos de confianza del 95% a partir de ambos regímenes de dosificación para valores de CLCR de 10 a 100 mL/min. Se calcularon también los porcentajes de pacientes que alcanzaban la exposición diana en cada caso.

Estos resultados pusieron de manifiesto que las dosis de valganciclovir administradas según ficha técnica para cada valor de CLCR eran adecuadas excepto para valores de $\text{CLCR} < 30$ mL/min en cuyo caso se observó sobreexposición con porcentajes desde 92.4% ($\text{CLCR} = 20$ mL/min) a 98.8% ($\text{CLCR} = 10$ mL/min) de pacientes con exposiciones iguales o superiores a 45 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$) (valores medios de AUC: de 93.46 a 190.35 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$)). Aunque en menor grado, también en el caso en el caso de CLCR de 60 a 70 mL/min, el 77.2% y 65.5% de los pacientes, respectivamente, presentaron exposiciones iguales o superiores a 45 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$) (valores medios de AUC: de 62.15 a 54.41 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$)).

Tras la administración IV, se observó una tendencia a una sobreexposición en pacientes de $\text{CLCR} < 30$ mL/min, con porcentajes de pacientes con exposiciones iguales o superiores a 45 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$), del 83.6 al 100% (valores medios de AUC: de 62.12 a 128.74 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$)). Se observó también una infraexposición, en

pacientes de $CLCR \geq 80$ mL/min, con porcentajes de pacientes con exposiciones iguales o superiores a 45 ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$), del 3.9 al 14.4% (Valores medios de AUC: de 26.55 a 32.70 ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)). Además los pacientes de $CLCR = 50$ mL/min parecían estar infraexpuestos, puesto que solo el 3.5% de ellos presentaban exposiciones iguales o superiores a la diana seleccionada (valor medio de AUC: 25.36 ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)). Ello sugería que este grupo debería recibir una dosis más alta que la indicada según ficha técnica (2.5 mg/kg de ganciclovir cada 12 horas).

Como era de esperar, los valores obtenidos de AUC tras simular los regímenes de dosificación calculados mediante el modelo estuvieron dentro del intervalo de 40-50 ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$) en todos los casos y los porcentajes estimados de pacientes que alcanzaban la exposición diana fueron siempre del 40 al 50%.

Futuras líneas de actuación

Las siguientes líneas de actuación propuestas, para la aplicación óptima del modelo en la individualización de la dosis durante la monitorización terapéutica, han sido:

- a) Validación externa del modelo con datos de pacientes de otro grupo de la misma población pero que no haya sido incluido para el desarrollo del modelo.
- b) Desarrollo de una estrategia de muestreo limitado para conocer los tiempos óptimos de extracción de muestra, compatibles con la práctica clínica, para la individualización de las dosis durante la monitorización terapéutica.

Por otra parte, sería interesante la inclusión de datos de más pacientes y ocasiones en el modelo de forma que fuera posible la incorporación del peso como covariable en los parámetros farmacocinéticos, así como poder estimar la variabilidad interocasión.

Finalmente el desarrollo de este modelo farmacocinético ha constituido la etapa previa al estudio farmacocinético-farmacodinámico poblacional para establecer la relación entre exposición al ganciclovir y erradicación de la carga viral. Se trata de un modelo mecanístico de respuesta indirecta [201] que permitiría establecer con

datos de nuestra propia población, el valor de exposición diana a utilizar durante la monitorización terapéutica para la individualización de las dosis.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Una estrategia de tratamiento secuencial corta de la infección/enfermedad por citomegalovirus humano basada en ganciclovir IV (5mg/Kg/12h) durante 5 días seguido de valganciclovir oral (900 mg/12h) durante 16 días, ajustada a la función renal, proporciona una terapia efectiva y segura con erradicación viral en el 66.7% y persistencia viral en el 33.3% de los pacientes. Aunque estos resultados deben considerarse con cautela por tratarse de un estudio piloto con bajo número de pacientes.
2. La carga viral basal es un buen predictor de la tasa de curación al final del tratamiento.
3. Los pacientes con persistencia de carga viral positiva al finalizar el tratamiento eran pacientes con carga viral basal alta o considerados de alto riesgo (hCMVD+/R- o hCMVD+/R+ tratados con anticuerpos policlonales). En estos pacientes, de acuerdo con las recomendaciones de las guías actuales se debería individualizar la duración de la terapia hasta la completa erradicación del virus.
4. Todas las recidivas clínicas ocurrieron en pacientes de alto riesgo hCMV D+/R-, dándose un total de 4 episodios en 3 pacientes (19%).
5. El perfil de seguridad fue aceptable tras el tratamiento secuencial de ganciclovir IV seguido de valganciclovir oral.
6. La exposición a ganciclovir tras la administración de ganciclovir IV y valganciclovir oral estuvo de acuerdo con la observada en estudios previos. La exposición obtenida con valganciclovir oral fue de media 1,24 veces superior a la obtenida con ganciclovir IV, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.054$) y sin observarse acumulación del fármaco, sugiriendo que el valganciclovir oral podría substituir al ganciclovir IV desde el inicio del tratamiento.
7. Se ha desarrollado un modelo farmacocinético poblacional para el ganciclovir tras la administración de ganciclovir iv /valganciclovir oral en pacientes trasplantados de órgano sólido.

8. Los datos experimentales disponibles han permitido la inclusión de variabilidad interindividual en el aclaramiento plasmático (CL), volumen de distribución en compartimento central (V_1), constante de velocidad de absorción (K_a) y biodisponibilidad (F). Por otra parte, no ha podido incluirse variabilidad interocasión en ninguno de los parámetros farmacocinéticos.

9. La función renal estimada por Cockcroft-Gault ha resultado ser el único factor predictivo del aclaramiento de ganciclovir, reduciendo la variabilidad interindividual asociada a dicho parámetro aproximadamente en un 52%.

10. Los valores de "shrinkage" y las técnicas de validación interna utilizadas han demostrado la robustez de las estimas individuales de los parámetros farmacocinéticos y la capacidad predictiva del modelo, respectivamente.

11. La aplicación del modelo desarrollado mediante la herramienta de la simulación ha permitido evaluar el régimen de dosificación actual de ganciclovir IV y valganciclovir oral según ficha técnica. Los resultados obtenidos sugieren en el caso del ganciclovir IV que los pacientes con $CL_{cr} < 30 \text{ mL/min}$ presentan tendencia a la sobreexposición, mientras que los pacientes con $CL_{cr} = 50$ y $CL_{cr} > 80 \text{ mL/min}$ presentan infraexposición. En el caso del valganciclovir oral, tanto los pacientes con $CL_{cr} < 30$ y CL_{cr} entre 60-70 mL/min tienden a la sobreexposición.

12. El cálculo de las dosis iniciales para cada valor de CL_{CR} , utilizando el modelo, incrementa el porcentaje de pacientes con exposiciones dentro de la diana terapéutica, particularmente en aquellos casos mal dosificados según ficha técnica.

13. El modelo desarrollado ha demostrado ser válido para la individualización de la dosis durante la monitorización terapéutica, previa validación del mismo en un grupo externo de pacientes. Asimismo, constituye la etapa previa para el desarrollo de un modelo farmacocinético-farmacodinámico poblacional que permita individualizar el régimen de dosificación de ganciclovir/valganciclovir en base a la erradicación de la carga viral en la población de pacientes trasplantados de órgano sólido.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Gandhi, M.K. and R. Khanna, *Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(12): p. 725-38.
2. Crough, T. and R. Khanna, *Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 76-98, Table of Contents.
3. Taylor, G.H., *Cytomegalovirus*. Am Fam Physician, 2003. **67**(3): p. 519-24.
4. Sinclair, J. and P. Sissons, *Latency and reactivation of human cytomegalovirus*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 1763-79.
5. Sia, I.G. and R. Patel, *New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(1): p. 83-121, table of contents.
6. Staras, S.A., et al., *Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(9): p. 1143-51.
7. Colugnati, F.A., et al., *Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States*. BMC Infect Dis, 2007. **7**: p. 71.
8. De-Ory FM, S.M., Castañeda RL, Ramírez FR, León PR et al., *Seroepidemiología frente a citomegalovirus en una comunidad de Madrid*. Rev Esp Sal Pub, 2001. **75**: p. 55-62.
9. Chen, D.H., et al., *Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus*. Virology, 1999. **260**(1): p. 10-6.
10. Mocarski ES, S.T., Pass RF, *Cytomegaloviruses*. . 5th edition ed. In Fields virology, ed. H.P. Knipe DM. 2007, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2701-2772.
11. Davison, A.J., et al., *The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 1): p. 17-28.
12. Varnum, S.M., et al., *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10960-6.
13. Emery, V.C., et al., *The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo*. J Exp Med, 1999. **190**(2): p. 177-82.
14. Murphy, E. and T. Shenk, *Human cytomegalovirus genome*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 1-19.
15. Rowshani, A.T., et al., *Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients*. Transplantation, 2005. **79**(4): p. 381-6.
16. Stinski, M.F., *Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides*. J Virol, 1978. **26**(3): p. 686-701.
17. Cantrell, S.R. and W.A. Bresnahan, *Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication*. J Virol, 2006. **80**(12): p. 6188-91.

18. Kalejta, R.F., *Tegument proteins of human cytomegalovirus*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(2): p. 249-65, table of contents.
19. AuCoin, D.P., et al., *Betaherpesvirus-conserved cytomegalovirus tegument protein ppUL32 (pp150) controls cytoplasmic events during virion maturation*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 8199-210.
20. Silva, M.C., et al., *Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids*. J Virol, 2003. **77**(19): p. 10594-605.
21. Krosky, P.M., et al., *The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase*. J Virol, 2003. **77**(14): p. 7720-7.
22. Wolf, D.G., et al., *Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 257-63.
23. Tandon, R. and E.S. Mocarski, *Control of cytoplasmic maturation events by cytomegalovirus tegument protein pp150*. J Virol, 2008. **82**(19): p. 9433-44.
24. Slobedman, B. and E.S. Mocarski, *Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus*. J Virol, 1999. **73**(6): p. 4806-12.
25. Soderberg, C., et al., *Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection*. J Virol, 1993. **67**(6): p. 3166-75.
26. Taylor-Wiedeman, J., et al., *Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells*. J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 9)**: p. 2059-64.
27. Schrier, R.D., J.A. Nelson, and M.B. Oldstone, *Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection*. Science, 1985. **230**(4729): p. 1048-51.
28. Mendelson, M., et al., *Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors*. J Gen Virol, 1996. **77 (Pt 12)**: p. 3099-102.
29. Senechal, B., et al., *Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4207-15.
30. Grefte, A., et al., *Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection*. J Infect Dis, 1993. **167**(2): p. 270-7.
31. Sinzger, C., et al., *Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues*. J Gen Virol, 1995. **76 (Pt 4)**: p. 741-50.
32. Sissons, J.G., M. Bain, and M.R. Wills, *Latency and reactivation of human cytomegalovirus*. J Infect, 2002. **44**(2): p. 73-7.
33. Kutza, A.S., et al., *High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(5): p. 1076-82.
34. Mutimer, D.J., et al., *Enhanced (cytomegalovirus) viral replication after transplantation for fulminant hepatic failure*. Liver Transpl Surg, 1997. **3**(5): p. 506-12.

35. Prosch, S., et al., *Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappaB*. *Virology*, 1995. **208**(1): p. 197-206.
36. Bain, M. and J. Sinclair, *The S phase of the cell cycle and its perturbation by human cytomegalovirus*. *Rev Med Virol*, 2007. **17**(6): p. 423-34.
37. Razonable, R.R. and V.C. Emery, *Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27-29 February 2004*. *Herpes*, 2004. **11**(3): p. 77-86.
38. Razonable, R.R. and C.V. Paya, *Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections*. *Herpes*, 2003. **10**(3): p. 60-5.
39. Fishman, J.A., *Introduction: infection in solid organ transplant recipients*. *Am J Transplant*, 2009. **9 Suppl 4**: p. S3-6.
40. Pereyra, F. and R.H. Rubin, *Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients*. *Curr Opin Infect Dis*, 2004. **17**(4): p. 357-61.
41. Anonymous, *Cytomegalovirus*. *Am J Transplant*, 2004. **4 Suppl 10**: p. 51-8.
42. Cope, A.V., et al., *Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation*. *J Infect Dis*, 1997. **176**(6): p. 1484-90.
43. Eid, A.J. and R.R. Razonable, *Cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients: advances lead to new challenges and opportunities*. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 2007. **12**(6): p. 610-617
10.1097/MOT.0b013e3282f0d386.
44. Patel, R., et al., *Cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplant recipients*. *Transplantation*, 1996. **61**(9): p. 1279-89.
45. Eid, A.J. and R.R. Razonable, *New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation*. *Drugs*, 2010. **70**(8): p. 965-81.
46. Razonable, R.R., et al., *Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir*. *J Infect Dis*, 2001. **184**(11): p. 1461-4.
47. Peleg, A.Y., et al., *Risk factors, clinical characteristics, and outcome of Nocardia infection in organ transplant recipients: a matched case-control study*. *Clin Infect Dis*, 2007. **44**(10): p. 1307-14.
48. Song, A.T., et al., *Does mycophenolate mofetil increase the risk of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients?--A mini-review*. *Braz J Infect Dis*, 2006. **10**(2): p. 132-8.
49. Nashan, B., et al., *Review of cytomegalovirus infection findings with mammalian target of rapamycin inhibitor-based immunosuppressive therapy in de novo renal transplant recipients*. *Transplantation*, 2012. **93**(11): p. 1075-85.

50. Brennan, D.C., et al., *Cytomegalovirus incidence between everolimus versus mycophenolate in de novo renal transplants: pooled analysis of three clinical trials*. Am J Transplant, 2011. **11**(11): p. 2453-62.
51. DesJardin, J.A., et al., *Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection*. J Infect Dis, 1998. **178**(6): p. 1783-6.
52. Tong, C.Y., et al., *Association of human herpesvirus 7 with cytomegalovirus disease in renal transplant recipients*. Transplantation, 2000. **70**(1): p. 213-6.
53. Kumar, D., et al., *Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients*. Am J Transplant, 2009. **9**(5): p. 1214-22.
54. Cervera, C., et al., *The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections*. Transplantation, 2007. **83**(11): p. 1493-500.
55. Manuel, O., et al., *Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation*. Transplantation, 2007. **83**(3): p. 359-62.
56. Loeffler, J., et al., *Polymorphisms in the genes encoding chemokine receptor 5, interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein 1 contribute to cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem cell transplantation*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(5): p. 1847-50.
57. La Rosa, C., et al., *Programmed death-1 expression in liver transplant recipients as a prognostic indicator of cytomegalovirus disease*. J Infect Dis, 2008. **197**(1): p. 25-33.
58. Mocarski, E.S., Jr., *Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion*. Trends Microbiol, 2002. **10**(7): p. 332-9.
59. Hertel, L., et al., *Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7563-74.
60. Khan, N., *The immunological burden of human cytomegalovirus infection*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. **55**(5): p. 299-308.
61. Sylwester, A.W., et al., *Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects*. J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 673-85.
62. Giulieri, S. and O. Manuel, *QuantiFERON(R)-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity*. Expert Rev Mol Diagn, 2011. **11**(1): p. 17-25.
63. Abate, D., et al., *Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(8): p. 2501-7.

64. Bestard, O., et al., *Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation*. Am J Transplant, 2013. **13**(7): p. 1793-805.
65. Emery, V.C., et al., *Human cytomegalovirus (HCMV) replication dynamics in HCMV-naive and -experienced immunocompromised hosts*. J Infect Dis, 2002. **185**(12): p. 1723-8.
66. Emery, V.C., et al., *Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation*. Lancet, 2000. **355**(9220): p. 2032-6.
67. Ljungman, P., P. Griffiths, and C. Paya, *Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients*. Clin Infect Dis, 2002. **34**(8): p. 1094-7.
68. Humar, A. and M. Michaels, *American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation*. Am J Transplant, 2006. **6**(2): p. 262-74.
69. Eid, A.J., et al., *Clinical features and outcomes of cytomegalovirus retinitis after transplantation*. Transpl Infect Dis, 2008. **10**(1): p. 13-8.
70. Sagedal, S., H. Rollag, and A. Hartmann, *Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients is associated with impaired survival irrespective of expected mortality risk*. Clin Transplant, 2007. **21**(3): p. 309-13.
71. Limaye, A.P., et al., *Impact of cytomegalovirus in organ transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis*. Transplantation, 2006. **81**(12): p. 1645-52.
72. Arthurs, S.K., et al., *Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(6): p. 840-6.
73. Paya, C., et al., *Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients*. Am J Transplant, 2004. **4**(4): p. 611-20.
74. Fearon, W.F., et al., *Changes in coronary arterial dimensions early after cardiac transplantation*. Transplantation, 2007. **83**(6): p. 700-5.
75. Thomas, L.D., et al., *Long-term outcomes of cytomegalovirus infection and disease after lung or heart-lung transplantation with a delayed ganciclovir regimen*. Clin Transplant, 2009. **23**(4): p. 476-83.
76. Dzabic, M., et al., *Intragraft cytomegalovirus protein expression is associated with reduced renal allograft survival*. Clin Infect Dis, 2011. **53**(10): p. 969-76.
77. Wang, E.H., et al., *Pneumocystis pneumonia in solid organ transplant recipients: not yet an infection of the past*. Transpl Infect Dis, 2012. **14**(5): p. 519-25.
78. Nebbia, G., et al., *Exploring the bidirectional interactions between human cytomegalovirus and hepatitis C virus replication after liver transplantation*. Liver Transpl, 2007. **13**(1): p. 130-5.

79. Hodson, E.M., et al., *Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials*. Lancet, 2005. **365**(9477): p. 2105-15.
80. Razonable, R.R., et al., *Detection of simultaneous beta-herpesvirus infections in clinical syndromes due to defined cytomegalovirus infection*. Clin Transplant, 2003. **17**(2): p. 114-20.
81. Razonable, R.R. and C.V. Paya, *The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation*. Liver Transpl, 2002. **8**(8): p. 651-8.
82. Fishman, J.A. and R.H. Rubin, *Infection in organ-transplant recipients*. N Engl J Med, 1998. **338**(24): p. 1741-51.
83. Rodrigo, E., et al., *New-onset diabetes after kidney transplantation: risk factors*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(12 Suppl 3): p. S291-5.
84. Hartmann, A., S. Sagedal, and J. Hjelmesaeth, *The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients*. Transplantation, 2006. **82**(2 Suppl): p. S15-7.
85. Ozdemir, F.N., et al., *The association between cytomegalovirus infection and atherosclerotic events in renal transplant recipients*. Transplant Proc, 2007. **39**(4): p. 990-2.
86. Bosch, W., et al., *Association of cytomegalovirus infection and disease with recurrent hepatitis C after liver transplantation*. Transplantation, 2012. **93**(7): p. 723-8.
87. Opelz, G., B. Dohler, and A. Ruhstroth, *Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: a collaborative transplant study report*. Am J Transplant, 2004. **4**(6): p. 928-36.
88. Lurain, N.S. and S. Chou, *Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(4): p. 689-712.
89. Crumpacker, C.S., *Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases*. Am J Med, 1992. **92**(2A): p. 3S-7S.
90. Ho, H.T., et al., *Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine*. Mol Pharmacol, 1992. **41**(1): p. 197-202.
91. Kuppermann, B.D., *Therapeutic options for resistant cytomegalovirus retinitis*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997. **14** Suppl 1: p. S13-21.
92. Gilbert, C. and G. Boivin, *Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(3): p. 873-83.
93. McGavin, J.K. and K.L. Goa, *Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients*. Drugs, 2001. **61**(8): p. 1153-83.
94. Matthews, T. and R. Boehme, *Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir*. Rev Infect Dis, 1988. **10** Suppl 3: p. S490-4.

95. Hamzeh, F.M. and P.S. Lietman, *Intranuclear accumulation of subgenomic noninfectious human cytomegalovirus DNA in infected cells in the presence of ganciclovir*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991. **35**(9): p. 1818-23.
96. Noble, S. and D. Faulds, *Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients*. *Drugs*, 1998. **56**(1): p. 115-46.
97. Faulds, D. and R.C. Heel, *Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections*. *Drugs*, 1990. **39**(4): p. 597-638.
98. Biron, K.K., et al., *Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(8): p. 2473-7.
99. Crumpacker, C.S., *Ganciclovir*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(10): p. 721-9.
100. Boeckh, M., et al., *A study of the pharmacokinetics, antiviral activity, and tolerability of oral ganciclovir for CMV prophylaxis in marrow transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1998. **4**(1): p. 13-9.
101. Roche, *Cytovene®-IV (ganciclovir sodium for injection) and Cytovene® (ganciclovir capsules) prescribing information*. 2000-Sept.
102. Fletcher, C.V. and H.H. Balfour, Jr., *Evaluation of ganciclovir for cytomegalovirus disease*. *DICP*, 1989. **23**(1): p. 5-12.
103. Fletcher, C., et al., *Human pharmacokinetics of the antiviral drug DHPG*. *Clin Pharmacol Ther*, 1986. **40**(3): p. 281-6.
104. Markham, A. and D. Faulds, *Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection*. *Drugs*, 1994. **48**(3): p. 455-84.
105. Czock, D., et al., *Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir in renal impairment*. *Clin Pharmacol Ther*, 2002. **72**(2): p. 142-50.
106. Combarrous, F., et al., *Pharmacokinetics of ganciclovir in a patient undergoing chronic haemodialysis*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1994. **46**(4): p. 379-81.
107. Lake, K.D., et al., *Ganciclovir pharmacokinetics during renal impairment*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988. **32**(12): p. 1899-900.
108. Freeman, R.B., *Valganciclovir: oral prevention and treatment of cytomegalovirus in the immunocompromised host*. *Expert Opin Pharmacother*, 2004. **5**(9): p. 2007-16.
109. Drew, W.L., et al., *Oral ganciclovir as maintenance treatment for cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. Syntex Cooperative Oral Ganciclovir Study Group*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(10): p. 615-20.
110. Lalezari, J., et al., *A safety study of oral valganciclovir maintenance treatment of cytomegalovirus retinitis*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002. **30**(4): p. 392-400.
111. Humar, A., et al., *The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients*. *Am J Transplant*, 2010. **10**(5): p. 1228-37.

112. Martin, D.F., et al., *A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis*. N Engl J Med, 2002. **346**(15): p. 1119-26.
113. Sugawara, M., et al., *Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2*. J Pharm Sci, 2000. **89**(6): p. 781-9.
114. Brown, F., et al., *Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers*. Clin Pharmacokinet, 1999. **37**(2): p. 167-76.
115. Pescovitz, M.D., et al., *Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(10): p. 2811-5.
116. Jung, D. and A. Dorr, *Single-dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive subjects*. J Clin Pharmacol, 1999. **39**(8): p. 800-4.
117. Paya, C. and R.R. Razonable, *Cytomegalovirus infection following solid organ transplantation*. *Transplant Infections 2nd Edition*. 2nd Edition ed. 2003, New York: Lippincott Williams & Wilkins.
118. Razonable, R.R. and C.V. Paya, *Valganciclovir for the prevention and treatment of cytomegalovirus disease in immunocompromised hosts*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2004. **2**(1): p. 27-41.
119. Spector, S.A., et al., *Oral ganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in persons with AIDS*. Roche Cooperative Oral Ganciclovir Study Group. N Engl J Med, 1996. **334**(23): p. 1491-7.
120. Gane, E., et al., *Randomised trial of efficacy and safety of oral ganciclovir in the prevention of cytomegalovirus disease in liver-transplant recipients*. The Oral Ganciclovir International Transplantation Study Group [corrected]. Lancet, 1997. **350**(9093): p. 1729-33.
121. Paya, C.V., et al., *Preemptive use of oral ganciclovir to prevent cytomegalovirus infection in liver transplant patients: a randomized, placebo-controlled trial*. J Infect Dis, 2002. **185**(7): p. 854-60.
122. Limaye, A.P., et al., *Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants*. Lancet, 2000. **356**(9230): p. 645-9.
123. Limaye, A.P., *Antiviral resistance in cytomegalovirus: an emerging problem in organ transplant recipients*. Semin Respir Infect, 2002. **17**(4): p. 265-73.
124. Anderson, R.D., et al., *Ganciclovir absolute bioavailability and steady-state pharmacokinetics after oral administration of two 3000-mg/d dosing regimens in human immunodeficiency virus- and cytomegalovirus-seropositive patients*. Clin Ther, 1995. **17**(3): p. 425-32.
125. Pescovitz, M.D., et al., *Oral ganciclovir dosing in transplant recipients and dialysis patients based on renal function*. Transplantation, 1998. **66**(8): p. 1104-7.
126. Wiltshire, H., et al., *Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir, in solid organ transplant recipients*. Clin Pharmacokinet, 2005. **44**(5): p. 495-507.
127. Fortun Abete, J., et al., *Pharmacokinetics of oral valganciclovir and intravenous ganciclovir administered to prevent cytomegalovirus disease in*

- an adult patient receiving small-intestine transplantation. Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(7): p. 2782-3.
128. Roche, *Cytovene (ganciclovir capsules). Product information*, Roche Pharmaceuticals: Nutley. New Jersey-USA.
129. Roche, *Cytovene IV (ganciclovir sodium for injection). Product information*, Roche Pharmaceuticals: Nutley. New Jersey-USA.
130. Roche, *Valcyte (valganciclovir hydrochloride). Product information*, Roche Pharmaceuticals: Nutley. New Jersey-USA.
131. Kalil, A.C., et al., *Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. Ann Intern Med*, 2005. **143**(12): p. 870-80.
132. Small, L.N., J. Lau, and D.R. Snydman, *Preventing post-organ transplantation cytomegalovirus disease with ganciclovir: a meta-analysis comparing prophylactic and preemptive therapies. Clin Infect Dis*, 2006. **43**(7): p. 869-80.
133. Humar, A. and D. Snydman, *Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. Am J Transplant*, 2009. **9 Suppl 4**: p. S78-86.
134. Kotton, C.N., et al., *International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. Transplantation*, 2010. **89**(7): p. 779-95.
135. San Juan, R., et al., *A new strategy of delayed long-term prophylaxis could prevent cytomegalovirus disease in (D+/R-) solid organ transplant recipients. Clin Transplant*, 2009. **23**(5): p. 666-71.
136. Snydman, D.R., et al., *Use of combination cytomegalovirus immune globulin plus ganciclovir for prophylaxis in CMV-seronegative liver transplant recipients of a CMV-seropositive donor organ: a multicenter, open-label study. Transplant Proc*, 2001. **33**(4): p. 2571-5.
137. Snydman, D.R., et al., *Cytomegalovirus immune globulin prophylaxis in liver transplantation. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med*, 1993. **119**(10): p. 984-91.
138. Werner, B.G., et al., *Cytomegalovirus immune globulin for the prevention of primary CMV disease in renal transplant patients: analysis of usage under treatment IND status. The Treatment IND Study Group. Transplant Proc*, 1993. **25**(1 Pt 2): p. 1441-3.
139. Humar, A., et al., *Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. Transplantation*, 1999. **68**(9): p. 1305-11.
140. de la Torre-Cisneros, J., et al., *GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2011. **29**(10): p. 735-58.
141. Asberg, A., et al., *Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. Am J Transplant*, 2007. **7**(9): p. 2106-13.
142. Caldes, A., et al., *Sequential treatment of cytomegalovirus infection or disease with a short course of intravenous ganciclovir followed by oral*

- valganciclovir: efficacy, safety, and pharmacokinetics*. *Transpl Infect Dis*, 2010. **12**(3): p. 204-12.
143. Asberg, A., et al., *Long-term outcomes of CMV disease treatment with valganciclovir versus IV ganciclovir in solid organ transplant recipients*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(5): p. 1205-13.
144. Stratta, R.J., C. Pietrangeli, and G.M. Baillie, *Defining the risks for cytomegalovirus infection and disease after solid organ transplantation*. *Pharmacotherapy*, 2010. **30**(2): p. 144-57.
145. Sia, I.G., et al., *Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation*. *J Infect Dis*, 2000. **181**(2): p. 717-20.
146. Emery, V.C. and P.D. Griffiths, *Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(14): p. 8039-44.
147. Kijpittayarit, S., et al., *Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation*. *Clin Infect Dis*, 2007. **44**(10): p. 1315-20.
148. San Juan, R., et al., *Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation*. *Clin Infect Dis*, 2008. **47**(7): p. 875-82.
149. Ozaki, K.S., et al., *The use of sirolimus in ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in renal transplant recipients*. *Clin Transplant*, 2007. **21**(5): p. 675-80.
150. Limaye, A.P., *Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients*. *Clin Infect Dis*, 2002. **35**(7): p. 866-72.
151. Lurain, N.S., et al., *Analysis and characterization of antiviral drug-resistant cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients*. *J Infect Dis*, 2002. **186**(6): p. 760-8.
152. Li, F., et al., *Incidence and clinical features of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease in heart transplant recipients*. *Clin Infect Dis*, 2007. **45**(4): p. 439-47.
153. Isada, C.M., et al., *Clinical characteristics of 13 solid organ transplant recipients with ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection*. *Transpl Infect Dis*, 2002. **4**(4): p. 189-94.
154. Boivin, G., et al., *Clinical impact of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in solid organ transplant patients*. *Transpl Infect Dis*, 2005. **7**(3-4): p. 166-70.
155. Mylonakis, E., W.M. Kallas, and J.A. Fishman, *Combination antiviral therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients*. *Clin Infect Dis*, 2002. **34**(10): p. 1337-41.
156. Rowland, M. and L. Benet, *Pharmacometrics: a new journal section*. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1982. **10**(4): p. 349-350.
157. FDA. *Food and Drug Administration (FDA): Guidance for industry: Population Pharmacokinetics*. 1999 [cited 2013 10/11/2013]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM072137.pdf>.

158. EMEA. *Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analysis*. 2007 [cited 2013 10/11/2013]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500003067.
159. Williams, P.J. and E.I. Ette, *Pharmacometrics: impacting drug development and Pharmacotherapy (chapter I)*. Pharmacometrics: the science of quantitative pharmacology. 2007: John Wiley and Sons, Inc.
160. Domenech, J., J. Martinez, and C. Peraire, eds. *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Vol I*. Vol. I. 2013, Ed. Síntesis: Madrid.
161. Godfrey, K., *Compartmental Models and Their Application* 1983, New York: Academic Press. 293.
162. Sheiner, L.B. and S.L. Beal, *Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data*. J Pharmacokinetics Biopharm, 1980. **8**(6): p. 553-71.
163. Sheiner, L.B. and S.L. Beal, *Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data*. J Pharmacokinetics Biopharm, 1981. **9**(5): p. 635-51.
164. Sheiner, L.B. and S.L. Beal, *Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. III. Monoexponential model: routine clinical pharmacokinetic data*. J Pharmacokinetics Biopharm, 1983. **11**(3): p. 303-19.
165. Whiting, B., A.W. Kelman, and J. Grevel, *Population pharmacokinetics. Theory and clinical application*. Clin Pharmacokinetics, 1986. **11**(5): p. 387-401.
166. Sheiner, L.B., *Analysis of pharmacokinetic data using parametric models. II. Point estimates of an individual's parameters*. J Pharmacokinetics Biopharm, 1985. **13**(5): p. 515-40.
167. Beal, S.L., *Population pharmacokinetic data and parameter estimation based on their first two statistical moments*. Drug Metab Rev, 1984. **15**(1-2): p. 173-93.
168. Rosenbaum, S.E., A.A. Carter, and M.N. Dudley, *Population Pharmacokinetics: Fundamentals, Methods and Applications*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1995. **21**(9): p. 1115-1141.
169. MALLET, A., *A maximum likelihood estimation method for random coefficient regression models*. Biometrika, 1986. **73**(3): p. 645-656.
170. Schumitzky, A., *Non parametric EM algorithms for estimating prior distributions*. Applied Mathematics and Computations, 1991. **45**: p. 143-157.
171. Beal, S.L., A.J. Boeckham, and L.B. Sheiner, *NONMEM: user's guide*. 1988-1992, University of California at St. Francisco: San Francisco(CA).
172. Yamaoka, K., T. Nakagawa, and T. Uno, *Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations*. J Pharmacokinetics Biopharm, 1978. **6**(2): p. 165-75.
173. Wahlby, U., E.N. Jonsson, and M.O. Karlsson, *Assessment of actual significance levels for covariate effects in NONMEM*. J Pharmacokinetics Pharmacodynamics, 2001. **28**(3): p. 231-52.

174. Hooker, A.C., C.E. Staats, and M.O. Karlsson, *Conditional weighted residuals (CWRES): a model diagnostic for the FOCE method*. Pharm Res, 2007. **24**(12): p. 2187-97.
175. Brendel, K., et al., *Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004*. Clin Pharmacokinet, 2007. **46**(3): p. 221-34.
176. Efron, B., *Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife*. Annals of Statistics, 1979. **7**(1): p. 1-26.
177. Bergstrand, M. and M.O. Karlsson, *Handling data below the limit of quantification in mixed effect models*. AAPS J, 2009. **11**(2): p. 371-80.
178. Yano, Y., S.L. Beal, and L.B. Sheiner, *Evaluating pharmacokinetic/pharmacodynamic models using the posterior predictive check*. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2001. **28**(2): p. 171-92.
179. Mentre, F. and S. Escolano, *Prediction discrepancies for the evaluation of nonlinear mixed-effects models*. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2006. **33**(3): p. 345-67.
180. Sheiner, L.B. and S.L. Beal, *Some suggestions for measuring predictive performance*. J Pharmacokinet Biopharm, 1981. **9**(4): p. 503-12.
181. Savic, R.M. and M.O. Karlsson, *Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions*. AAPS J, 2009. **11**(3): p. 558-69.
182. Sheiner, L.B., et al., *Forecasting individual pharmacokinetics*. Clin Pharmacol Ther, 1979. **26**(3): p. 294-305.
183. Perrottet, N., et al., *Population pharmacokinetics of ganciclovir in solid-organ transplant recipients receiving oral valganciclovir*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(7): p. 3017-23.
184. Merigan, T.C., et al., *A controlled trial of ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after heart transplantation*. N Engl J Med, 1992. **326**(18): p. 1182-6.
185. Wiltshire, H., et al., *Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients*. Transplantation, 2005. **79**(11): p. 1477-83.
186. Babel, N., et al., *Treatment of cytomegalovirus disease with valganciclovir in renal transplant recipients: a single center experience*. Transplantation, 2004. **78**(2): p. 283-5.
187. Fellay, J., et al., *Treatment of cytomegalovirus infection or disease in solid organ transplant recipients with valganciclovir*. Transplant Proc, 2005. **37**(2): p. 949-51.
188. Humar, A., et al., *A prospective assessment of valganciclovir for the treatment of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients*. J Infect Dis, 2005. **192**(7): p. 1154-7.
189. Singh, N., et al., *Efficacy of valganciclovir administered as preemptive therapy for cytomegalovirus disease in liver transplant recipients: impact on viral load and late-onset cytomegalovirus disease*. Transplantation, 2005. **79**(1): p. 85-90.

190. Ghanekar, S.A., et al., *Gamma interferon expression in CD8(+) T cells is a marker for circulating cytotoxic T lymphocytes that recognize an HLA A2-restricted epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein pp65*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(3): p. 628-31.
191. Manuel, O., et al., *Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(6): p. 817-24.
192. Diaz-Pedroche, C., et al., *Efficacy and safety of valgancyclovir as preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients*. Transplant Proc, 2005. **37**(9): p. 3766-7.
193. Trevillyan J., et al., *Electronic estimations of renal function are inaccurate in solid-organ transplant recipients and can result in significant underdosing of prophylactic valganciclovir*. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Aug;57(8):4058-60.
194. Yuen, G.J., et al., *Population differences in ganciclovir clearance as determined by nonlinear mixed-effects modelling*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(10): p. 2350-2.
195. Savic, R.M., et al., *Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies*. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2007. **34**(5): p. 711-26.
196. Karlsson, M.O. and L.B. Sheiner, *The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses*. J Pharmacokinet Biopharm, 1993. **21**(6): p. 735-50.
197. Karlsson, M.O. and R.M. Savic, *Diagnosing model diagnostics*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(1): p. 17-20.
198. Anderson, B.J. and N.H. Holford, *Mechanistic basis of using body size and maturation to predict clearance in humans*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(1): p. 25-36.
199. Bergstrand, M., et al., *Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models*. AAPS J, 2011. **13**(2): p. 143-51.
200. Sheppard, C.W., *Computer simulation of stochastic processes through model-sampling (Monte Carlo) techniques*. FEBS Lett, 1969. 2 Suppl 1: p. S14-S21.
201. Colom, H., et al. *Population Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Ganciclovir after Intravenous Ganciclovir and Oral Valganciclovir Administration in SOT Patients Infected with CMV*[abstract 2261]. 20th Meeting, Population Approach Group in Europe; 2011 Jun 7-10. Available from URL: <http://www.page-meeting.org/?abstract=2261>.

